



Catarina Viegas de Sousa

Licenciada em Engenharia Agrónómica

Microalgas: do Tratamento de Efluentes para a Biorrefinaria

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Energia e Bioenergia

Orientadora: Prof.^a Doutora Benilde Simões Mendes, FCT-UNL

Coorientadora: Doutora Luísa Maria Gouveia da Silva, LNEG

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves

Arguente: Prof. Doutora Ana Cristina Ramos de Oliveira Justino

Vogal: Doutora Luísa Maria Gouveia da Silva



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Outubro 2014

Catarina Viegas de Sousa

**Microalgas:
do Tratamento de Efluentes para a Biorrefinaria**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Energia e Bioenergia

Orientadora: Professora Doutora Benilde Mendes
Coorientadora: Doutora Luísa Maria Gouveia da Silva

Monte da Caparica

Setembro, 2014

FICHA TÉCNICA

Título: Microalgas: do Tratamento de Efluentes para a Biorrefinaria

Autora: Catarina Viegas de Sousa

Objetivo do presente trabalho: Dissertação apresentada à Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, para a obtenção do grau de Mestre em Energia e Bioenergia

Orientadora: Professora Doutora Benilde Mendes

Coorientadora: Doutora Luísa Maria Gouveia da Silva (Investigadora Auxiliar LNEG)

Contactos do autor: catarina.viegas.de.sousa@gmail.com

Local: Monte da Caparica

Data: Setembro de 2014

Copyright ©

O conteúdo da presente dissertação é da inteira responsabilidade da autora.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido, ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Partes do presente trabalho foram submetidas para publicação:

Subcapítulo 5.1

Graça, S., Sousa, C., Ambrosano, L., Hall, L., Oliveira, A.C., Ribeiro, B., Gouveia, L. (2014); Production of valuable microalgal biomass by treating Urban Wastewater. Submetido *Algal Research* (Ref. No.: ALGAL-D-14-00148)

Subcapítulo 5.7

Batista, A.P., Ambrosano, L., Graça, S., Sousa, C., Marques, P., Ribeiro, B., Botrel, E., Neto, P. e Gouveia, L. (2014); Combining urban wastewater with biohydrogen production - an integrated microalgae-based approach; *Bioresource Technology* (Ref. No.: BITE-D-14-04819)

Agradecimentos

Ao longo de mais uma etapa no meu percurso académico, que culmina com a escrita da dissertação, muitas são as pessoas que compõem o meu álbum de memórias e que permitiram que este caminho fosse muito satisfatório e enriquecedor, a nível académico e pessoal. Assim, gostaria de deixar o meu profundo agradecimento:

Às minhas orientadoras, Doutora Luísa Gouveia pela sua energia contagiante, boa disposição e apoio constante na realização de todo o trabalho experimental, que tanto me entusiasmou e fascinou e à Professora Doutora Benilde Mendes, pela orientação para além do trabalho e por todo o afeto e sabedoria que sempre demonstrou.

À Professora Doutora Ana Cristina Oliveira, pela atenção e ajuda preciosa na realização e análise de diversos resultados experimentais.

Às Doutoradas Ana Paula Batista e Beatriz Nobre, pela disponibilidade e paciência com que sempre estiveram presentes na realização de vários trabalhos experimentais.

Ao Lucas Ambrosano, pela entreajuda, flexibilidade e humor que permitiram muitas vezes ultrapassar alguns momentos mais complicados e à Sofia Graça pela disponibilidade e constante ajuda.

A todos os investigadores, estagiários, bolseiros e funcionários da Unidade de Bioenergia do LNEG, por me terem recebido tão bem, em especial aos meus colegas de gabinete e laboratório pela sua alegria, carinho e companheirismo e, claro, pelos ótimos momentos de convívio.

Aos meus amigos que estiveram sempre presentes e me apoiaram incondicionalmente neste ano um pouco conturbado. Em especial à Ana Maria Costa, ao António Araújo, à Catarina Nobre, à Joana Pinto, à Rita Abecasis, ao Tiago Couto, à Vera Ferreira e ao Vítor Silva pelo carinho especial, partilha e cumplicidade.

Por fim, quero agradecer à Mena, à Vitória e ao Fernando, o núcleo familiar, pela paciência, ternura e o apoio absoluto em todas as minhas decisões.

Quero agradecer ao projeto *WW-SIP - From Urban Wastewater Treatment Plant to Self Sustainable Integrated Platform for Wastewater Refinement* (LIFE10 ENV/IT/000308) que possibilitou este trabalho de investigação e ao LNEG (Laboratório Nacional de Energia e Geologia), por permitir a minha integração neste projeto.

Resumo

Este trabalho teve como objetivo o tratamento de águas residuais urbanas usando diversas microalgas: *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* e um consórcio de microalgas (isoladas a partir do próprio efluente). Adicionalmente, a biomassa microalgal obtida foi valorizada para obtenção de biocombustíveis e outros compostos de elevado valor comercial, como pigmentos, utilizando tecnologias de baixo custo para a sua produção, colheita e secagem.

Todas as microalgas foram eficientes na remoção dos nutrientes das águas residuais, tendo sido atingidas remoções máximas (N e P) superiores a 80% para todas as microalgas testadas. Alcançaram-se produtividades de $0,98\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, $0,90\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e $0,38\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ para *S. obliquus*, Consórcio C e *C. vulgaris*, respetivamente.

A microalga *S. obliquus* foi a que apresentou maior teor em lípidos ($0,24\text{g}$ óleo/ g peso seco) e hidratos de carbono, tendo originado a produção de $56,8\text{mL}$ Hidrogénio/ g SV, através da fermentação no escuro com a *Enterobacter aerogenes*. Esta microalga revelou ser a candidata mais promissora para a simultânea remoção de nutrientes dos efluentes residuais e produção de biodiesel, biohidrogénio e compostos de elevado valor, como pigmentos.

O elevado teor em proteína apresentado por todas as microalgas estudadas permite a utilização dessa biomassa para a produção de rações animais ou de biocompósitos e bioplásticos.

Foi testada uma técnica não convencional para colheita das microalgas, a eletrocoagulação, que originou uma economia de mais de 94% de energia face à centrifugação (usada como único método de colheita). Para a secagem da biomassa, foi utilizado um secador solar que, além de não ter consumido qualquer energia elétrica, ainda apresentou a vantagem de constituir um processo mais rápido do que as duas alternativas testadas (estufa e liofilizador).

Palavras-chave: microalgas, efluentes urbanos, biorrefinaria, biodiesel, biohidrogénio, eletrocoagulação

Abstract

The aim of this work was the treatment of urban wastewater by different microalgae: *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and a consortium of microalgae (isolated from own urban wastewater). In addition, the microalgal biomass obtained was valorised to produce biofuels and high added-value compounds, like pigments, using low-cost technologies for their production, harvesting and drying.

All microalgae were effective in removing nutrients from wastewater. The maximum nutrients (N and P) removal rates were higher than 80% for all tested microalgae and the productivities achieved were $0.98\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, $0.90\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ and $0.38\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ to *S. obliquus*, Consortium C and *C. vulgaris*, respectively.

The microalga *S. obliquus* presented the highest lipid content (0.24g oil/g dw) and carbohydrates, generating $56.8\text{mL Hydrogen/g VS}$, through dark fermentation using *Enterobacter aerogenes* bacteria. This microalgae revealed to be the most promising candidate for the simultaneous removal of nutrients from wastewater and production of biodiesel, biohydrogen and high value compounds, such as pigments.

The high protein content presented by all studied microalgae allows the use of their biomass for animal feed or to the production of biocomposites and bioplastics.

Electrocoagulation, a non-conventional technique for harvesting microalgae, was tested and resulted in an energy saving of 94%, compared with centrifugation (when using alone). For drying the biomass, a prototype of a solar dryer was used resulting in two advantages: no energy was consumed and the process was faster than the experienced alternatives (oven and freeze-dryer).

Keywords: microalgae, urban wastewater, biorefinery, biodiesel, biohydrogen, electrocoagulation

Índice Geral

Agradecimentos	ix
Resumo	xi
Abstract.....	xiii
Enquadramento	1
Objetivos	1
1. Introdução	2
1.1 Microalgas e sua utilização na produção de biocombustíveis	2
1.2 Produção de biomassa algal	4
1.2.1 Fotobiorreatores para produção de microalgas	6
1.2.2 Utilização de águas residuais	7
1.2.3 Carência de nutrientes e produtividade em óleos	8
1.3 Colheita	9
1.3.1 Floculação.....	10
1.3.2 Eletrocoagulação/ eletrofloculação/ eletroflotação.....	12
1.3.3 Centrifugação	13
1.4 Secagem	13
1.4.1 Em estufa.....	14
1.4.2 Em liofilizador	14
1.4.3 Em secador solar	14
1.5 Rutura celular	14
1.6 Extração.....	15
1.6.1 Com solventes químicos	15
1.6.2 Acelerada por solvente.....	15
1.6.3 Com CO ₂ supercrítico	16
1.7 Transesterificação	16
1.7.1 Transesterificação direta ou <i>in-situ</i>	18
1.8 Biocombustíveis e outros compostos de valor comercial.....	18
1.8.1 Biodiesel	19
1.8.2 Bioetanol	20
1.8.3 Biogás	21
1.8.4 Biohidrogénio	21
1.8.5 Outros compostos com valor comercial, produzidos por microalgas	22
1.9 Conceito de biorrefinaria	29
2. Parte Experimental.....	33
2.1 Microalgas	33
2.2 Efluente residual	33

2.3 Fotobiorreator	34
2.4 Produção das microalgas no fotobiorreator com água residual	35
2.5 Procedimentos de análise para o efluente e sobrenadante	36
2.6 Ensaio de eletrocoagulação (EC)	37
2.7 Caraterização da biomassa microalgal	38
2.7.1 Conteúdo em Lípidos	38
2.7.2 Caraterização da Fração Lipídica	39
2.7.3 Conteúdo em Açúcares	41
2.7.4 Conteúdo em Proteínas	42
2.7.5 Conteúdo em Pigmentos	42
2.8 Obtenção de biodiesel a partir de biomassa microalgal	43
2.8.1 Transesterificação direta ou <i>in situ</i>	43
2.9 Produção de Biohidrogénio por fermentação no escuro	44
3. Resultados e Discussão	47
3.1 Produtividade das microalgas e eficiência de remoção dos nutrientes	47
3.2 Colheita de microalgas: eletrocoagulação <i>versus</i> centrifugação	49
3.3 Secagem de microalgas: estufa, liofilizador e secador solar	51
3.4 Caraterização da biomassa algal	53
3.4.1 Conteúdo em Cinzas	53
3.4.2 Conteúdo em Lípidos	53
3.4.3 Conteúdo em Açúcares	55
3.4.4 Conteúdo em Proteínas	55
3.4.5 Conteúdo em Pigmentos	56
3.5 Caracterização da Fração Lipídica	59
3.5.1 Composição em Ácidos Gordos	59
3.5.2 Teor de Matéria Saponificável	60
3.5.3 Índices de acidez e de iodo	61
3.6 Produção de biodiesel por transesterificação direta	62
3.7 Produção de Biohidrogénio	63
4. Conclusões	67
5. Referências Bibliográficas	69
Anexos 1	79

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Tanques abertos para produção de microalgas em Earthrise Farms, California, EUA.....	6
Figura 1.2 – Fotobiorreatores tubulares na NPDEAS, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.....	6
Figura 1.3 – Classificação dos processos de ruptura celular aplicáveis a microalgas.....	15
Figura 1.4 – PHB no interior de <i>Ralstonia eutropha</i>	29
Figura 1.5 – Biocombustíveis que podem ser produzidos a partir de microalgas	30
Figura 2.1 – Observação microscópica das microalgas do Consórcio C.....	33
Figura 2.2 – Fotobiorreator de 150L: a) esquema simplificado e b) fotografia.....	34
Figura 2.3 – Procedimentos para a determinação do peso seco.....	35
Figura 2.4 – Centrifugação das microalgas.....	36
Figura 2.5 – a) Diagrama esquemático do sistema de eletrocoagulação b) fotografia do sistema.....	37
Figura 2.6 – a) Moinho de bolas (Retsch), b) amostra intacta e amostra moída.....	38
Figura 2.7 – a) Extração de óleos em Soxhlet, b) separação do solvente dos óleos, no Rotavapor.....	38
Figura 2.8 – Hidrólise Ácida: a) amostras e aparelho de digestão em funcionamento, b) filtração.....	39
Figura 2.9 – Extração e determinação dos açúcares totais	41
Figura 2.10 – a) aparelho de digestão, b) aparelho de destilação, c) titulação	42
Figura 2.11 – a) preparação da placa de sílica gel, b) placa de sílica gel na fase final da eluição	43
Figura 2.12 – Transesterificação direta	44
Figura 3.1 - controlo e após o processo de EC a 0,2A durante 6 minutos	49
Figura 3.2 – Eficiências de remoção de biomassa para diferentes amperagens e áreas de elétrodos.....	50
Figura 3.3 – Estimativa do consumo energético para diferentes cenários de colheita de microalgas.....	51
Figura 3.4 – Secador Solar SECMAD, LNEG: a) exterior, b) interior com a biomassa a secar.....	52
Figura 3.5 – Temperatura e humidade no interior e exterior do secador solar, durante o período de ensaios de secagem da biomassa no secador solar.....	52
Figura 3.6 – Conteúdo lipídico das microalgas em estudo, expresso em % ps	54
Figura 3.7 – Conteúdo em hidratos de carbono das microalgas em estudo, expresso em % ps.....	55
Figura 3.8 – Conteúdo em proteínas das microalgas em estudo, expresso em % ps.....	56
Figura 3.9 – Conteúdo em pigmentos totais das microalgas em estudo, expresso em % ps.....	57
Figura 3.10 – Perfil de pigmentos totais na <i>Chlorella vulgaris</i> obtido no espectrofotómetro.....	57
Figura 3.11 – Perfil de pigmentos totais na <i>Scenedesmus obliquus</i> obtido no espectrofotómetro.....	57
Figura 3.12 – Perfil de pigmentos totais no Consórcio C obtido no espectrofotómetro.....	58
Figura 3.13 – Resultado da cromatografia em camada fina	58
Figura 3.14 – Perfil de ácidos gordos no óleo da <i>Chlorella vulgaris</i> obtido por cromatografia gasosa.....	60
Figura 3.15 – Cinética de fermentação de microalgas por <i>Enterobacter aerogenes</i> para produção de bioH ₂	63
Figura 3.16 – Cinética de fermentação da biomassa microalgal por <i>E. aerogenes</i> para a produção de bioH ₂	64
Figura 3.17 – Produção específica de BioH ₂ obtida da fermentação da biomassa microalgal por <i>E. aerogenes</i>	65
Figura 3.18 – Evolução dos ácidos succínico, láctico, fórmico e propanoico, ao longo da fermentação da biomassa algal por <i>E. aerogenes</i>	65

Índice de Tabelas

Tabela 1.1– Conteúdo em óleo de algumas espécies de microalgas.....	4
Tabela 1.2 – Principais vantagens e desvantagens dos tanques ABERTOS.....	7
Tabela 1.3 – Principais vantagens e desvantagens dos fotobiorreatores FECHADOS.....	7
Tabela 1.4 – Valores limite de emissão na descarga de águas residuais.....	8
Tabela 1.5 – Alguns parâmetros de qualidade do biodiesel descritos na EN 14214.....	20
Tabela 1.6 – Conteúdo em hidratos de carbono de algumas microalgas.....	20
Tabela 1.7 – Conteúdo em proteínas de algumas microalgas.....	23
Tabela 1.8 – Alguns pigmentos produzidos por microalgas.....	24
Tabela 1.9 – Trabalhos experimentais com microalgas numa base de biorrefinaria.....	31
Tabela 2.1 - Datas das alimentações e respetivos volumes introduzidos no fotobiorrator	34
Tabela 2.2 – Nº de dias que as culturas de microalgas estiveram sob <i>stress</i> nutritivo.....	35
Tabela 2.3 - Temperatura média do ar e a insolação média mensal durante os ensaios.....	35
Tabela 2.4 – Ésteres metílicos e respetivos fatores de multiplicação.....	41
Tabela 3.1 – Caraterização dos efluentes residuais de Águas da Figueira (AdF) usadas nos ensaios.....	47
Tabela 3.2 – Taxas máximas de remoção de nutrientes e respetivas produtividades máximas, para cada alimentação, para as diferentes microalgas.....	48
Tabela 3.3 – Composição da biomassa algal.....	53
Tabela 3.4 – Percentagem de lípidos detetados na biomassa em função do pré-tratamento.....	54
Tabela 3.5 – Ácidos gordos presentes nos extratos de óleo de <i>Cv</i> , <i>Sc</i> e <i>Cons. C</i>	59
Tabela 3.6 – Teor de matéria saponificável das diversas microalgas em estudo	61
Tabela 3.7 – Índice de acidez e índice de iodo para as várias biomassas analisadas	61
Tabela 3.8 – Percentagem de ésteres metílicos produzidos a partir das biomassas microalgais de <i>Cv</i> , <i>Sc</i> e <i>Cons. C</i> através do processo de transesterificação direta e respetivos rendimentos	62
Tabela 3.9 – Parâmetros de ajustamento do modelo modificado de Gompertz	64

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

ACOI - Coimbra Collection of Algae
AdF - Águas da Figueira
AGE - ácidos gordos essenciais
 Al_2O_3 - Óxido de alumínio
ASE - extração acelerada por solvente
C16:0 - ácido palmítico
C18:1 - ácido oleico
C18:2 - ácido linoleico
C18:3 - ácido linolénico
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - Cloreto de cálcio dihidratado
CaO - Óxido de cálcio
 CO_2 - Dióxido de carbono
Cons. C - Consórcio C
CQO - Carência Química de Oxigénio
Cv - *Chlorella vulgaris*
DHA - ácido docosa-hexaenóico
dw - dry weight
EC - eletrocoagulação
EPA - ácido eicosapentaenóico
EPS - substâncias poliméricas extracelulares
FAME - fatty acid methyl esters (ésteres metílicos de ácidos gordos)
g - grama
g - força g ($9,80665 \text{ m/s}^2$)
 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ - grama por litro por dia
GC - cromatografia gasosa
GEE - gases com efeito de estufa
GLA - ácido gama-linolénico
h - hora
 H_2 - Hidrogénio
 H_2O - água
 H_2SO_4 - Ácido sulfúrico
HCl - Ácido clorídrico
HDPE - polietileno de alta densidade
HgO - Óxido de mercúrio
INETI - Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação
 K_2HPO_4 - Fosfato dipotássico
 K_2SO_4 - Sulfato de potássio
 KH_2PO_4 - Fosfato monopotássico
KI - Iodeto de potássio
KOH - Hidróxido de potássio
kWh - quilowatt hora
L - litro
LCA - avaliação do ciclo de vida
LDPE - polietileno de baixa densidade
LNEG - Laboratório Nacional de Energia e Geologia
 $\text{mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ - miliamperes por centímetro quadrado
mg - miligrama
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - Sulfato de magnésio heptahidratado

N_2 - azoto
 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ - Molibdato de sódio dihidratado
 Na_2SeO_3 - Selénito de sódio
NaOH - Hidróxido de sódio
 NH_4^+ - ião amónio
 $(NH_4)_2SO_4$ - Sulfato de amónio
 $NiCl_2$ - Cloreto de níquel
nm - nanómetro
 NO_3^- - nitrato
 O_2 - Oxigénio
p/p - peso por peso
p/v - peso por volume
 P_2O_5 - Pentóxido de fósforo
PBR - fotobiorreatores
PBS - polibutileno succinato
PET - politereftalato de etileno
PHA - polihidroxiálcanoatos
PHB - polihidroxi-butirato
PLA - ácido polilático
 PO_4^{3-} - fosfato
ps - peso seco
PS - poliestireno
PSLC - peso seco livre de cinzas
PUFA - ácidos gordos poli-insaturados
rpm - rotações por minuto
 s^{-1} - segundo
Sc - *Scenedesmus obliquus*
SV - sólidos voláteis
TFF - filtração com fluxo tangencial
TLC - cromatografia de camada fina
v/v - volume por volume
VS - volatile solids
vvm - volume de gás por volume de cultura por minuto
 $\mu E/m^{-2} \cdot s^{-1}$ - microeinsteins por segundo por metro quadrado
 μL - microlitro
 μm - micrómetro

Enquadramento

As águas residuais urbanas constituem uma importante fonte de nutrientes e poluentes das águas doces e dos ecossistemas marinhos, sendo as tecnologias atuais para o seu tratamento dispendiosas ou apenas parcialmente eficazes. A remoção de azoto e fósforo, dos efluentes residuais, mediada por microalgas tem diversos benefícios. Para além da redução potencial da eutrofização das massas de água, N e P podem ser eficientemente recuperados e reciclados para a produção de biomassa algal, que é adequada para a produção de biocombustíveis e outros produtos não-combustíveis, como fertilizantes e rações para alimentação animal, pigmentos e antioxidantes, bioplásticos e biocompósitos.

A produção de bioenergia nos países desenvolvidos tornou-se um tópico intenso nos últimos anos, principalmente naqueles que não apresentam reservas de petróleo. Este debate deve-se à crescente preocupação acerca das limitações dos combustíveis de origem fóssil, nomeadamente os constantes aumentos de preços, a distribuição global das jazidas - maioritariamente localizadas em zonas politicamente instáveis - a diminuição dos *stocks* existentes e a contribuição do uso destes no aumento dos níveis de dióxido de carbono atmosférico. Existe, portanto, uma necessidade de independência energética aliada a uma cada vez maior consciencialização ambiental, sendo assim necessárias soluções energéticas sustentáveis para alimentar todo o planeta.

Neste cenário, que tenderá eventualmente a piorar, é de extrema importância encontrar alternativas ecológicas e economicamente viáveis que possam fazer face à crescente procura energética por parte das sociedades mundiais. Essas alternativas passaram, numa primeira fase, por culturas energéticas como a soja, a colza e o óleo de palma para a produção de biocombustíveis de 1ª geração. No entanto, esta solução não poderá assegurar a produção necessária de combustíveis a nível mundial, acarretando consequências desastrosas para os ecossistemas e a competição com a produção de bens alimentares. Posteriormente, surgiram os biocombustíveis de 2ª geração, constituídos por materiais lenhocelulósicos, que, apesar de não competirem com o setor alimentar, não conseguirão assegurar a produção desejável de biocombustíveis.

Os microorganismos fotossintéticos possuem um potencial enorme como fonte de transformação da energia solar em energia química, ao apresentarem elevadíssimas taxas de produção de biomassa, muito superiores à das plantas vasculares. O desenvolvimento de processos e tecnologia que permitam extrair destes organismos compostos para a produção de biocombustíveis de 3ª geração é, desde modo, uma solução altamente desejável, com a vantagem de poderem ser produzidos em terrenos marginais, usando águas salgadas, salobras ou mesmo residuais.

Têm sido realizados diversos estudos para a produção de biocombustíveis a partir de microalgas, no entanto essas alternativas não são ainda economicamente atrativas.

Objetivos

Tratar águas urbanas residuais com tecnologia simples, sustentável e económica. Valorizar a biomassa microalgal obtida, produzindo diferentes biocombustíveis de forma atrativa e sustentável, utilizando o conceito de biorrefinaria e tecnologias de baixo custo na produção, colheita e secagem da biomassa algal.

1. Introdução

Os combustíveis fósseis tornaram-se elementos chave na sociedade humana a partir da 2ª Guerra Mundial, contribuindo para a melhoria da qualidade de vida das pessoas e para o desenvolvimento tecnológico, uma vez que a sua queima gera energia para os transportes e eletricidade. No entanto, por se tratar de fontes de energia não renováveis, são limitados e contribuem para o agravamento de diversos problemas ambientais. Entre eles o aquecimento global, diretamente implicado com o aumento dos níveis de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera. Para além das questões ambientais existe atualmente uma crise energética que se tem manifestado por todo o mundo devido à crescente procura energética para fazer face à rápida industrialização e ao aumento da população humana (Chisti, 2007; Li *et al.*, 2008; Demirbas, 2010; Lam & Lee, 2012).

Neste contexto, a procura de fontes de energia renovável tornou-se um desafio primordial para o desenvolvimento sustentável das sociedades atuais e futuras. Presentemente, já são utilizadas diversas fontes de energia renovável como a solar, a eólica, a hídrica e a biomassa o que permite limitar o uso de combustíveis fósseis. No entanto, segundo a Agência Internacional de Energia, os combustíveis renováveis e os resíduos são os que apresentam maior potencial de entre as diversas fontes renováveis. Sendo previsível que o biodiesel venha a desempenhar um papel crucial como fonte de energia renovável num futuro próximo (Lam & Lee, 2012).

As microalgas têm sido alvo de muitos estudos por constituírem uma matéria-prima alternativa para a produção de biodiesel e bioetanol, nomeadamente devido ao seu rápido crescimento e à capacidade de acumular elevadas quantidades de lípidos e hidratos de carbono. Para além disso estes microorganismos não necessitam de solos aráveis, podem ser utilizados na purificação de águas residuais e contribuem para a mitigação de CO₂. A fixação de CO₂ atmosférico pelas microalgas tem uma eficiência dez vezes superior à das plantas terrestres e a sua biomassa pode ser utilizada para produzir uma enorme variedade de produtos utilizados na alimentação humana e animal, cosméticos, medicamentos, fertilizantes e biocombustíveis (Lam & Lee, 2012; Pires *et al.*, 2012).

1.1 Microalgas e sua utilização na produção de biocombustíveis

As microalgas são organismos fotossintéticos microscópicos que se encontram distribuídos tanto em águas doces como em águas salgadas. Contêm cerca de 50% de carbono na sua biomassa, na maior parte dos casos obtido através do dióxido de carbono atmosférico. Por esta razão têm atraído interesse como veículos para a mitigação de carbono dos processos industriais (Milledge, 2011).

Estes organismos encontram-se categorizados em diversas classes, distinguindo-se principalmente pela sua pigmentação, ciclo de vida e estrutura celular básica. As quatro classes mais importantes de microalgas em termos de abundância são (Demirbas, 2010):

Bacillariophyceae (diatomáceas) são a forma de vida dominante no fitoplâncton e possivelmente representam o maior grupo de produtores de biomassa na Terra;

Chlorophyceae (algas verdes);

Chrysophyceae (algas douradas);

Cyanophyceae (cianobactérias) também referidas como microalgas.

Devido à elevada taxa de crescimento das microalgas os biocombustíveis de 3ª geração, que podem ser obtidos através destes organismos, são muito mais promissores do que os de 1ª geração, obtidos das culturas terrestres de oleaginosas ou ricas em açúcares. Para além da produtividade superior, a produção algal consome menos água e nutrientes do que as culturas terrestres e tem maior

tolerância a elevadas concentrações de CO₂, o que se traduz também em maiores taxas de conversão (Demirbas, 2010). As microalgas apresentam, assim, como grandes vantagens a não competição com as culturas alimentares, com a terra arável e com a água potável e fertilizantes. Tem sido desenvolvida muita investigação sobre a produção de variados biocombustíveis a partir da biomassa algal, incluindo biodiesel e bioóleo, bioetanol, biogás e biohidrogénio. Contudo, ainda existe uma enorme limitação à implementação de sistemas produtivos com base nestes organismos, devido às suas baixas eficiências volumétricas que conduzem ainda a custos demasiado elevados face ao petróleo (Ferreira *et al.*, 2013).

As cianobactérias e as microalgas são os únicos organismos conhecidos, até à data, capazes de realizar tanto a fotossíntese como a produção de hidrogénio. Estes microrganismos produzem diferentes matérias-primas para gerar energia, lípidos para a produção de biodiesel, hidrocarbonetos e isoprenóides para a produção de gasolina e hidratos de carbono para a produção de bioetanol. Além disso, a biomassa algal pode ser processada para produzir gás de síntese, seguida ou não de uma síntese de Fischer-Tropsch para produção de hidrocarbonetos líquidos, gaseificação hidrotérmica ou digestão anaeróbica para produção de metano, ou a típica combustão para produção de energia elétrica (Parmar *et al.*, 2011).

Uma equipa canadiana de investigadores defende que estes organismos podem ser utilizados para a produção de biocombustíveis de uma forma económica e ambientalmente sustentável, sendo possível substituir uma fração substancial do uso de combustíveis fósseis na nossa sociedade (Li *et al.*, 2008). Segundo Chisti (2008), todas as necessidades dos EUA em combustíveis para os transportes poderiam ser satisfeitas produzindo microalgas em menos de 11% da superfície agrícola desse país.

As microalgas para a produção de biodiesel são escolhidas, principalmente, em função do seu conteúdo em óleos. Na Tabela 1.1 é apresentado o conteúdo oleaginoso de algumas espécies de microalgas.

Segundo o Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL) dos EUA, as estirpes mais favoráveis para a produção de biodiesel pertencem às *Chlorophyceae* (algas verdes). Estas tendem a acumular lípidos em condições de deficiência de alguns nutrientes, nomeadamente azoto. Também as diatomáceas são recomendadas para a produção de biodiesel, mas para o seu crescimento é necessário fornecer silício à cultura (Jarvis, 2008). Assim, as microalgas apontadas como tendo maior potencial para a produção de biodiesel devido à sua produtividade em óleo têm sido: *Nannochloropsis* sp. (Ferreira *et al.*, 2013; Gouveia & Oliveira, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009), *Chlorella* sp. (Campenni' *et al.*, 2013; Rodolfi *et al.*, 2009), *Neochloris oleoabundans* (Mata *et al.*, 2010; Gouveia & Oliveira, 2009), *Dunaliella tertiolecta* (Mata *et al.*, 2010; Gouveia & Oliveira, 2009), *Botryococcus braunii* (Ruangsomboon, 2012; Mata *et al.*, 2010), *Haematococcus pluvialis* (Saha *et al.*, 2013; Damiani *et al.*, 2010), *Tetraselmis suecica* (Lee *et al.*, 2011; Mata *et al.*, 2010), *Phaeodactylum tricornutum* (Lee *et al.*, 2011; Rodolfi *et al.*, 2009) e *Scenedesmus obliquus* (Gouveia & Oliveira, 2009; Mandal & Mallick, 2009).

Tabela 1.1 – Conteúdo em óleo de algumas espécies de microalgas

Microalga	Conteúdo em óleo (% peso seco)	Referência
<i>Anabaena cylindrica</i>	4-7	Becker, 1994
<i>Botryococcus braunii</i>	29-75	Chisti, 2007
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	21	Becker, 1994
	5;	Fradique <i>et al.</i> , 2010;
<i>Chlorella vulgaris</i>	14-22;	Becker, 1994;
	5-58	Mata <i>et al.</i> , 2010
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20	Chisti, 2007
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37	Chisti, 2007
<i>Dunaliella primolecta</i>	23	Chisti, 2007
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	17-71;	Mata <i>et al.</i> 2010;
	17	Gouveia & Oliveira, 2009
<i>Euglena gracilis</i>	14-20	Becker, 1994
	25;	Mata <i>et al.</i> , 2010;
<i>Haematococcus pluvialis</i>	16-35;	Damiani <i>et al.</i> , 2010;
	40	Zhekisheva <i>et al.</i> , 2002
<i>Isochrysis galbana</i>	7-40	Mata <i>et al.</i> , 2010
<i>Nannochloris sp.</i>	20-35	Chisti, 2007
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68	Chisti, 2007;
	29	Gouveia & Oliveira, 2009
	35-54;	Chisti, 2007;
<i>Neochloris oleoabundans</i>	29;	Gouveia & Oliveira, 2009;
	56	Gouveia <i>et al.</i> , 2009
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47;	Chisti, 2007;
	16-47	Mata <i>et al.</i> , 2010
<i>Pavlova salina</i>	31	Mata <i>et al.</i> , 2010
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30	Chisti, 2007
<i>Porphyridium cruentum</i>	9-14	Becker, 1994
	12-14;	Becker, 1994;
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11-55;	Mata <i>et al.</i> , 2010;
	18	Gouveia & Oliveira, 2009
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77	Chisti, 2007
<i>Spirogyra sp.</i>	11-21	Becker, 1994
<i>Spirulina platensis</i>	4-9	Becker, 1994
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23;	Chisti, 2007

1.2 Produção de biomassa algal

O processo de produção da biomassa algal apresenta diversas vantagens comparativamente às culturas energéticas tradicionais, tendo a biomassa algal múltiplas aplicações (bioenergia, farmacêutica, alimentar, cosmética). Nas culturas energéticas oleaginosas um ciclo de produção dura de 3 meses a 3 anos, no caso das microalgas, a produção de óleo pode começar entre 3 e 5 dias, podendo o óleo ser recolhido diariamente. Estes organismos são produzidos ao longo de todo o ano, ao contrário da maior parte das culturas vegetais, que são sazonais. Por terem uma elevada eficiência fotossintética, possuem maior taxa de crescimento relativamente às plantas superiores, tendo uma capacidade de mitigar quantidades de CO₂ muito superior a qualquer outra cultura oleaginosa. As microalgas não necessitam que lhes seja fornecida água potável nem fertilizantes, sendo possível obterem os nutrientes a partir de águas residuais. Por fim, devido às baixas exigências de cultivo destes microrganismos, as culturas podem ser implementadas em terrenos degradados, baldios, desertos e até em estruturas *off-shore*, eliminando assim a competição com o setor alimentar (Demirbas, 2011).

Uma cultura de microalgas para produção de biocombustíveis à escala industrial requer uma quantidade elevada de nutrientes para atingir taxas de crescimento interessantes, nomeadamente azoto, na forma de nitrato, e fósforo, na forma de ortofosfato. Normalmente estes nutrientes são fornecidos na forma de fertilizantes químicos ou inorgânicos, por reduzirem o risco de contaminações no meio de cultura e permitirem a reutilização da água. No entanto, alguns estudos de avaliação do ciclo de vida (LCA) revelaram que cerca de 50% da energia consumida e da emissão de gases com efeito de estufa (GEE) estavam associados à utilização destes fertilizantes químicos, o que torna esta opção muito pouco sustentável do ponto de vista económico e ambiental (Lam & Lee, 2012; Clarens *et al.*, 2010). Esta desvantagem pode ser eliminada à custa do crescimento da biomassa microalgal usando águas residuais, uma estratégia que permite o tratamento dos efluentes, concomitantemente com a obtenção de uma biomassa, que poderá ser valorizada energeticamente e/ou com a obtenção de compostos de alto valor acrescentado.

O parâmetro que mais influencia a cinética de crescimento das microalgas é a luz. A taxa de crescimento das microalgas aumenta com o aumento da intensidade da luz, até um determinado valor. A iluminação pode ser fornecida de forma natural, artificial ou por conjugação de ambas. A intensidades luminosas elevadas os ciclos de luz/escurecimento também influenciam a produção de biomassa algal porque, nestas circunstâncias, podem ocorrer danos no fotossistema II, levando à redução da atividade fotossintética. Assim, durante o período de escurecimento as células têm oportunidade de reparar os danos induzidos pela luz (Pires *et al.*, 2012).

Um outro fator necessário à produção de biomassa algal é o fornecimento de CO₂ à cultura. O dióxido de carbono pode ser fornecido a partir de gases de combustão, que contêm cerca de 10 a 20% de CO₂, ou por injeção de ar atmosférico, que contem menos de 1% de CO₂. A injeção de gases na cultura fomenta também a agitação do meio, outro fator necessário para evitar a deposição das células e para permitir às células a intermitência luz/escurecimento.

Outros parâmetros que afetam a produtividade da cultura são a temperatura, o pH, a salinidade, a qualidade e quantidade dos nutrientes fornecidos, a concentração de oxigénio dissolvido e a presença de metais pesados (Pires *et al.*, 2012).

As microalgas possuem, muitas vezes, a capacidade de se adaptarem metabolicamente a alterações das condições ambientais, pelo que a produção de microalgas pode também ser conduzida heterotroficamente para algumas espécies, o que significa que a cultura consegue crescer na ausência de luz e utiliza compostos orgânicos como fonte de carbono e energia, tais como acetato, glucose, glicerol e etanol. A produção autotrófica pressupõe que as microalgas utilizem a luz como fonte de energia e o CO₂ como fonte de carbono (inorgânico) (Kirrolia *et al.*, 2013; Mata *et al.*, 2010).

O cultivo de microalgas heterotróficas apresenta várias vantagens, entre elas a eliminação da necessidade de luz, o bom controlo do processo produtivo e o baixo custo da colheita, porque a densidade celular obtida é muito mais elevada, assim como o conteúdo em óleos. No entanto se a fonte de carbono orgânico for proveniente de culturas alimentares, estaremos a competir com o setor alimentar, além disso o processo heterotrófico envolve respiração, com libertação de CO₂ (Kirrolia *et al.*, 2013; Lam & Lee, 2012), o que é pouco vantajoso do ponto de vista ambiental.

As culturas de microalgas podem ainda ser produzidas mixotroficamente, ou seja, utilizando carbono orgânico e luz. Usualmente a realização da fotossíntese é a fonte principal de energia, no entanto, os compostos orgânicos e o CO₂ são essenciais (Kirrolia *et al.*, 2013; Mata *et al.*, 2010). O crescimento das culturas em sistemas mixotróficos produz entre 3 e 10 vezes mais biomassa do que

os sistemas autotróficos, constituindo eventualmente uma alternativa competitiva à produção convencional de gasóleo (Kirrolia *et al.*, 2013).

Presentemente, apenas o processo autotrófico é técnica e economicamente viável para cultivar microalgas à escala comercial, frequentemente conduzido em ambiente exterior com luz solar abundante e gratuita (Lam & Lee, 2012).

Pode haver vantagem em associar a produção autotrófica com a heterotrófica, ligando os dois reatores através da fase gasosa. Esta situação possibilita a troca de O_2 e CO_2 entre eles, beneficiando o processo global de um efeito simbiótico. Esta experiência foi realizada com *Chlorella protothecoides* e alcançou uma produtividade e conteúdo lipídico mais elevados do que a produção separada num reator autotrófico, heterotrófico ou mixotrófico (Santos *et al.*, 2011).

A produção comercial de microalgas em larga escala iniciou-se em 1960's no Japão, com a cultura de *Chlorella* sp., mas só na década de oitenta é que se começaram a produzir em larga escala outras microalgas, como *Dunaliella salina* para β -caroteno, e só mais recentemente *Haematococcus pluvialis*, como fonte de astaxantina (Spolaore *et al.*, 2006).

1.2.1 Fotobiorreatores para produção de microalgas

A produção de microalgas pode ser conduzida em tanques abertos (*raceway ponds*) (Figura 1.1) (<http://www.ieaghg.org>) ou em sistemas fechados. Estas estruturas fechadas - fotobiorreatores (PBR) - podem apresentar-se em forma tubular ou em painéis (Figura 1.2) (<http://npdeas.blogspot.pt/>), e ser produzidas em diversos materiais. Sendo sistemas fechados não ocorrem trocas diretas com os gases exteriores e estão mais protegidos dos contaminantes.



Figura 1.1 – Tanques abertos para produção de microalgas em Earthrise Farms, California, EUA (Fonte: <http://www.ieaghg.org>)



Figura 1.2 – Fotobiorreatores tubulares na NPDEAS, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil (Fonte: <http://npdeas.blogspot.pt/>)

Os tanques abertos foram os primeiros a ser utilizados para a produção de microalgas, na década de oitenta. Os fotobiorreatores fechados foram sendo implementados com o intuito de colmatar alguns dos problemas dos sistemas abertos (Lee, 1986). Nas Tabelas 1.2 e 1.3 encontram-se as principais vantagens e desvantagens de cada um dos sistemas de produção de biomassa microalgal (Lam & Lee, 2012; Pires *et al.*, 2012; Singh & Sharma, 2012; Demirbas, 2010).

Tabela 1.2 – Principais vantagens e desvantagens dos tanques ABERTOS (Lam & Lee, 2012; Pires *et al.*, 2012; Demirbas, 2010).

Vantagens	Desvantagens
Simplicidade na operação	Elevado grau de contaminação
Menor investimento	Necessidade de grandes extensões de terra
Baixos consumos energéticos	Sujeitos às condições climáticas
Menores custos de produção	Ocorrência de elevada evaporação
	Impossibilidade de controlo de vários parâmetros de operação
	Menores produtividades

Tabela 1.3 – Principais vantagens e desvantagens dos fotobiorreatores FECHADOS (Lam & Lee, 2012; Pires *et al.*, 2012; Singh & Sharma, 2012; Demirbas, 2010).

Vantagens	Desvantagens
Possibilidade de produzir monoculturas	Complexidade na operação
Controlo dos parâmetros de operação	Elevado investimento
Reduzido grau de contaminação	Elevados consumos energéticos
Menor necessidade de área de implantação	Elevados custos de produção
Maiores produtividades	
Maior homogeneidade de produção	
Menores perdas de CO ₂	
Produção de compostos biofarmacêuticos complexos	

Os fotobiorreatores têm assim, como grande vantagem, uma maior produtividade por possibilitarem uma concentração de biomassa superior, não necessitando de áreas muito extensas para a produção. Têm também um tempo de colheita mais curto, permitem produzir monoculturas e controlar todos os fatores de produção (nutrientes, concentração de CO₂, temperatura, pH). Contudo, consomem mais energia, o que resulta em maiores custos de produção (Suali & Sarbatly, 2012; Parmar *et al.*, 2011; Demirbas, 2010). Também a implantação de todo o sistema produtivo é mais complexa o que conduz a custos mais elevados. Porém, nos últimos anos têm vindo a ser desenvolvidos materiais mais simples e baratos para os fotobiorreatores o que tem tornado estes sistemas mais apelativos (Pires *et al.*, 2012; Suali & Sarbatly, 2012; Demirbas, 2010).

No entanto, a produtividade nos fotobiorreatores é influenciada por diversos fatores, entre eles as espécies de microalgas utilizadas, a localização geográfica, a concentração de biomassa utilizada, o diâmetro dos tubos, a distância entre eles e o número de tubos por bloco. Os quatro últimos fatores relacionam-se estreitamente e têm de ser muito bem estudados em conjunto, antes de serem implementados devido ao ângulo da incidência solar. Um estudo recente comparou três localizações (Holanda, França e Argélia) através de modelos e encontrou diferenças muito significativas no que seria ideal para cada caso (Slegers *et al.*, 2013).

1.2.2 Utilização de águas residuais

Para a produção de microalgas os nutrientes podem ser fornecidos através de águas de escoamento superficial de terras próximas ou canalizando as águas residuais das estações de tratamento (Pires *et al.*, 2012). A utilização de águas residuais provenientes de tratamento primário ou secundário é uma solução atrativa do ponto de vista económico e ambiental e contém normalmente azoto e fósforo suficientes. Na estação de tratamento de águas residuais esses nutrientes têm de ser retirados, pois contribuem fortemente para a eutrofização das massas de água, e esse tratamento consome cerca de 60 a 80% da energia total (Lam & Lee, 2012). O uso de microalgas

no tratamento das águas residuais obvia o problema e produz concomitantemente uma fonte de bioenergia.

A ideia da utilização de microalgas no tratamento de águas residuais não é recente, mas é ainda muito limitada em larga escala. A remoção de fósforo das águas residuais é particularmente difícil, mas as microalgas são muito eficientes nesta remoção, assim como de azoto e metais pesados, razão pela qual podem desempenhar um papel muito importante nesta remediação (Pittman *et al.*, 2011). No entanto, esta estratégia ainda não está completamente estudada, já que a utilização de águas residuais se torna difícil para culturas à escala laboratorial e potencia a sua contaminação com bactérias e vírus (Lam & Lee, 2012).

Segundo vários investigadores, a única forma economicamente viável de obter biomassa algal para produzir biocombustíveis em larga escala, minimizando os impactos ambientais, é utilizar as microalgas para o tratamento de águas residuais (Abdelaziz *et al.*, 2013A; Park *et al.*, 2011; Pittman *et al.*, 2011). Alguns estudos demonstraram a eficiência de algumas espécies de microalgas em remover os nutrientes das águas residuais urbanas. Yan (2013) analisou a microalga *Chlorella vulgaris* revelando que a remoção dos nutrientes é largamente influenciada pelo rácio C/N e concluindo que o rácio ótimo de C/N é 5:1.

A produção de microalgas pode ser também associada a complexos industriais de forma a possibilitar que o CO₂ produzido nesses locais seja utilizado. A combinação da fixação do dióxido de carbono proveniente dos gases de combustão com a remoção dos nutrientes das águas residuais na produção de microalgas é uma alternativa muito promissora, tanto do ponto de vista económico como ambiental.

Em Portugal os parâmetros definidos para a libertação de águas residuais relativamente ao azoto, fósforo e carência química de oxigénio (CQO) são definidos pelo Decreto de lei nº 176 (1998) (Tabela 1.4).

Tabela 1.4 – Valores limite de emissão na descarga de águas residuais (Decreto de lei nº 176, 1998)

Parâmetro	Valor limite de emissão
CQO	150mg O ₂ /L
Fósforo Total	10mg P/L
Azoto amoniacal	10mg NH ₄ /L
Azoto total	15 mg N/L
Nitratos	50 mg NO ₃ /L

Uma vez que as águas residuais são um meio propício ao desenvolvimento de muitos microorganismos, a produtividade da biomassa algal que se pretenda fazer crescer pode diminuir devido à predação e competição direta pelos nutrientes. Por esta razão, a realização de um pré-tratamento da água residual pode ter efeitos muito benéficos na produtividade. Um dos métodos possíveis é a pré-desinfecção com raios ultravioleta. Um estudo em tanques abertos revelou que a densidade ótica e a percentagem de clorofila eram superiores no tanque tratado, o que indicava maior produtividade algal. No entanto, a biomassa total era superior no tanque não tratado. Apesar destas diferenças, a eficiência de remoção de carbono orgânico, de azoto amoniacal e de fosforo solúvel e a carência química de oxigénio foi muito similar em ambos os tanques (Santiago *et al.*, 2013).

1.2.3 Carência de nutrientes e produtividade em óleos

A carência de alguns nutrientes leva as microalgas a comportarem-se de forma diferente relativamente às suas reservas. Sabe-se que em condições de deficiência de azoto as microalgas

tendem a acumular uma quantidade superior de lípidos, de açúcares e de pigmentos, no entanto essa carência conduz a um menor crescimento da biomassa algal. Esta situação é explicada porque a abundância de azoto no meio favorece a síntese de amido nas microalgas, que suporta o seu crescimento (Lam & Lee, 2012). Contudo, em condições de déficit de azoto a via da síntese de amido é bloqueada e o carbono fixado pela fotossíntese é redirecionado para produzir ácidos gordos, o que conduz a uma acumulação superior em lípidos. Como o amido é a fonte de carbono e energia das células irá esgotar-se, reduzindo a eficiência da fotossíntese e levando a uma menor produção de biomassa (Lam & Lee, 2012).

Diversos estudos demonstraram que a produção de microalgas sem azoto induz o aumento de lípidos nas células. No caso da *Neochloris oleabundans* esse conteúdo atingiu os 56% (Gouveia *et al.*, 2009), para *Scenedesmus acutus* a produtividade total de lípidos passou de 29,51mg L⁻¹ dia⁻¹ para 80,99mg L⁻¹ dia⁻¹ na cultura sem azoto (Damiani *et al.* 2010). O excesso de luz pode também induzir aumentos no conteúdo em óleos, assim como em alguns pigmentos, como astaxantina no caso da *Haematococcus pluvialis* (Zhekiševa *et al.*, 2002) ou cantaxantina/astaxantina na *Chlorella vulgaris* (Gouveia *et al.*, 1996) e *Chlorella protothecoides* (Campenni' *et al.*, 2013).

Outra forma de induzir *stress* à cultura de microalgas é aumentar a concentração de sais no meio, nomeadamente cloreto de sódio. Campenni' e colaboradores (2013) testaram diferentes concentrações de NaCl e obtiveram mais carotenóides e lípidos nas células de *Chlorella protothecoides* para a concentração de 20g/L de NaCl (Campenni' *et al.*, 2013).

1.3 Colheita

Após o crescimento das microalgas, poderá seguir-se uma fase de colheita, onde se faz a separação da biomassa do meio de cultura (líquido) onde se encontram (Lam & Lee, 2012). Quase todos os métodos de produção de biomassa algal originam soluções diluídas, com 0,02 a 0,05% de sólidos (Abdelaziz *et al.*, 2013B). Sendo estes organismos microscópicos e se encontrarem em concentrações muito diluídas, a sua colheita e consequente separação, é um processo com elevados gastos energéticos que constituiu sempre um constrangimento à exploração em larga escala de culturas de biomassa algal. A maioria dos processos de colheita apresenta diversas desvantagens como custos muito elevados e contaminações com agentes floculantes que impossibilitam a utilização dessa biomassa para alimentação (Poelman *et al.*, 1997).

Os processos convencionais utilizados para a colheita de microalgas podem constituir mais de 30% do custo total da biomassa algal e são geralmente realizados em duas fases (Demirbas, 2010). Primeiro as microalgas em suspensão são aglutinadas, normalmente por processos de sedimentação natural, floculação ou flotação e seguidamente concentra-se a biomassa por processos de filtração ou centrifugação. A escolha do método depende da dimensão da cultura, da espécie, da densidade celular, das condições em que a cultura é produzida e do mercado e valor comercial do produto final (Abdelaziz *et al.*, 2013B; Demirbas, 2010).

Estudos de LCA em que se realizaram apenas os processos de centrifugação ou filtração por prensagem revelaram que a energia consumida nestes processos constituía cerca de 90% de toda a energia utilizada no LCA. Isto significa que as técnicas iniciais de separação da suspensão de microalgas podem ter um impacto muito significativo na redução do consumo energético da colheita, e posterior secagem da biomassa algal, que se reflete no balanço energético de todo o processo produtivo dos biocombustíveis. Atualmente a centrifugação e filtração ainda não são métodos energeticamente viáveis para a colheita de microalgas à escala comercial, por envolverem extensos consumos

energéticos, elevados investimentos e custos de manutenção que impossibilitam a prática operacional a longo prazo (Lam & Lee, 2012).

O processo de flotação consiste em borbulhar ar através da suspensão de microalgas levando a que estas se aglomerem à superfície, como uma espuma, sendo depois facilmente recolhidas (Parmar *et al.*, 2011). A eficiência deste processo depende de fatores como o pH e a força iónica, que devem ser otimizados antes de se usar a técnica. A adição de sais polieletrólitos e sais de alumínio ou ferro podem melhorar essa eficiência. A flotação é um método mais vantajoso e operacional do que a sedimentação (Abdelaziz *et al.*, 2013B).

Os processos de decantação ou sedimentação podem ser também utilizados, mas uma vez que têm por base a diferente densidade do meio e das partículas a separar, e nas microalgas a densidade é muito similar à do próprio meio, acaba por ser um processo muito lento. Esta limitação é visível no caso da *Chlorella* sp., cuja densidade ($1,070\text{g.cm}^{-3}$) é muito próxima da da água doce ou salgada, cerca de $0,998$ e $1,025\text{g.cm}^{-3}$ a 20°C , respetivamente. O tempo médio de sedimentação para as microalgas é normalmente muito longo e ronda os $0,1$ a $0,2\text{m.dia}^{-1}$ para algas verdes e diatomáceas. Outra limitação é a necessidade de muito espaço (Abdelaziz *et al.*, 2013B).

A separação por ultrassons é uma técnica que ainda está em desenvolvimento e que para ser aplicada em larga escala necessitará de muito mais estudos, principalmente no caso da produção em tanques abertos. Consiste basicamente em submeter as células em suspensão a uma onda ultrassónica e quando o campo é desligado as células agregadas sedimentam rapidamente pela força da gravidade (Suali & Sarbatly, 2012).

A filtração é um processo físico de separação de partículas sólidas em suspensão num fluido, com o recurso a um filtro ou membrana onde os sólidos ficam retidos. As membranas caracterizam-se por serem eficientes e seguras neste processo, no entanto para a colheita de biomassa algal podem revelar-se insatisfatórias por se tornar um método demorado. As membranas vão colmatando durante o processo de separação devido à adsorção, ao aumento da concentração dos compostos na superfície da membrana e ao entupimento dos poros. Existem alguns métodos que podem ser usados para evitar a colmatção dos poros, tais como utilizar fluxo cruzado em vez de filtração frontal, trabalhar com velocidades elevadas e escolher um sistema que induza instabilidade perto da superfície da membrana. Para microalgas com estruturas frágeis deverá ser selecionado um sistema de bombagem adequado, já que este método induz uma elevada tensão de corte nas células, tal como sucede com a centrifugação. Um sistema amplamente utilizado na colheita de células é o processo de filtração com fluxo tangencial (TFF), no qual o fluxo principal é paralelo à membrana filtrante e perpendicular ao fluxo permeado (Pires *et al.*, 2012).

Este método apresenta elevados custos de manutenção, devido à substituição das membranas e à bombagem, consumindo bastante energia ($0,3$ a 2kWh.m^{-3}). No entanto, já é utilizado em larga escala (Abdelaziz *et al.*, 2013B).

1.3.1 Floculação

A floculação é uma técnica para aumentar o tamanho dos agregados de células que tendem a depositar posteriormente por gravidade, facilitando a sua separação do meio onde se encontram. Usualmente é adicionado um composto ao meio (o floculante) que perturba a estabilidade das partículas em suspensão, incluindo os microorganismos, levando a que estas se agreguem (Suali & Sarbatly, 2012).

A floculação pode ser atingida de diferentes formas: floculação química, biofloculação e eletrofloculação. É um processo muito utilizado nas culturas de microalgas, por ser simples, rápido e apresentar custos muito mais reduzidos do que outros métodos de colheita (Pires *et al.*, 2012). O seu uso é no entanto limitado, devido à contaminação da biomassa, dependendo assim da aplicação subsequente da mesma.

Os floculantes mais eficazes são os de elevado peso molecular, normalmente polímeros, e podem ser naturais ou sintéticos (Suali & Sarbatly, 2012). O processo torna-se mais eficiente quando é introduzido na cultura um coagulante que se encontra eletricamente carregado com carga positiva. Isto sucede porque as células das microalgas têm sempre carga negativa o que leva a que se repilam umas às outras ficando em suspensão por longos períodos de tempo, mesmo sem agitação. O coagulante positivamente carregado vai neutralizar as cargas das microalgas. Desta forma, quando é introduzido o floculante este irá promover a aglomeração entre as células neutralizadas e a criação de flóculos densos que depositam naturalmente pela ação da gravidade (de Godos *et al.*, 2011).

Os agentes floculantes vulgarmente mais aplicados são o sulfato de alumínio e os cloretos de alumínio ou ferro. Por vezes é adicionada solução de hidróxido de sódio para aumentar o pH do meio e levar à deposição mais rápida das células em suspensão (Pires *et al.*, 2012). Contudo, os floculantes podem ter alguns inconvenientes, dependendo da sua composição, e contaminar a biomassa algal. No caso, por exemplo, dos sais polivalentes torna-se necessário utilizar dosagens elevadas para obter resultados satisfatórios e a sua eficácia é altamente dependente do pH. Para além disto leva à formação de grandes quantidades de lamas o que dificulta posteriormente a desidratação da biomassa (Lam & Lee, 2012).

A floculação permite atingir eficiências de colheita superiores a 90% e densidades de biomassa da ordem dos 15g/l e, para além disso, caracteriza-se por ser um processo operacional simples e de baixos custos, fatores importantes para a produção de biocombustíveis (Pires *et al.*, 2012).

A utilização de polímeros orgânicos como floculante, caso do amido, por exemplo, é mais recomendável por se tratar de um composto biodegradável e não tóxico e tem atraído o interesse dos investigadores. No entanto, no uso comercial os floculantes são sobretudo sintéticos. É importante referir que os floculantes catiónicos são ineficazes para as microalgas marinhas devido à inibição da força iónica da água do mar (Lam & Lee, 2012; Suali & Sarbatly, 2012).

Um outro floculante que tem vindo a ser testado é a quitosana, um subproduto da indústria do camarão e caranguejo, produzido a partir da quitina das carcaças destes animais. Já é amplamente utilizado em diversas indústrias, como a alimentar, química e farmacêutica, pois é um produto não tóxico e um polímero policationico biodegradável que já provou ser promissor como floculante de microalgas (Abdelaziz *et al.*, 2013B).

Uma nova linha de investigação nas tecnologias da floculação são os biofloculantes ou floculantes microbiais que resultam de um processo dinâmico de síntese de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) por células vivas. Bactérias, fungos e actinomicetas foram identificados como microorganismos produtores de biofloculantes como polissacáridos, proteínas funcionais e glicoproteínas (Lam & Lee, 2012). A biofloculação é uma alternativa muito interessante porque apresenta custos reduzidos e não conduz a contaminações com iões metálicos. À escala industrial o meio de cultura pode ainda ser reutilizado, diminuindo o custo com nutrientes e a recuperação de água. Porém, existe a necessidade de misturar grandes volumes de cultura, sendo necessário avaliar a energia gasta no processo (Pires *et al.*, 2012).

1.3.2 Eletrocoagulação/ eletrofloculação/ eletroflotação

A eletrocoagulação também apresenta custos reduzidos e não conduz praticamente a contaminações da biomassa algal (são libertados íons metálicos dos elétrodos durante o processo), possibilitando a utilização da biomassa para alimentação animal e humana (Pires *et al.*, 2012).

A eletrocoagulação, ou eletrofloculação, baseia-se no princípio do movimento de partículas eletricamente carregadas, num campo elétrico. Uma vez que as microalgas apresentam carga negativa, são atraídas para o ânodo. Quando o alcançam, perdem a sua carga e ficam em condição de formar agregados de algas. Como a eletrólise da água origina a produção de hidrogénio e oxigénio gasoso junto aos elétrodos, as bolhas de oxigénio produzidas sobem à superfície trazendo consigo agregados e flocos de algas, que podem ser facilmente recolhidos (Poelman *et al.*, 1997).

Poelman (1997) conduziu experiências com eletrocoagulação em diversas espécies de microalgas atingindo eficiências de recuperação de biomassa superiores a 90% em 35 minutos. Nesses estudos os elétrodos eram de alumínio e encontravam-se quase no fundo do reservatório. A eficiência do processo variou em função da quantidade e da distância a que foram colocados os ânodos dos cátodos. Quanto maior é a distância entre elétrodos, menor é a quantidade de energia consumida, mas maior é a duração do processo, até um determinado limite. No entanto, pode-se chegar a um compromisso entre o consumo energético do processo e a duração do mesmo, atingindo consumos de $0,3\text{kWh.m}^{-3}$ com eficiências de 96% para a floculação em 75 minutos ou atingindo a mesma eficiência em 45 minutos gastando o dobro da energia.

Numa outra investigação, com um método denominado eletro-coagulação-flotação, foram utilizados elétrodos de alumínio e detetou-se que a presença de íons cloro promovia a remoção das microalgas. A intensificação do processo pelos íons cloro devia-se ao facto de estes conduzirem a uma libertação superior de íons Al^{3+} dos elétrodos e minimizarem a corrosão e a deposição de um filme de óxido na superfície dos ânodos (Gao *et al.*, 2010).

O processo de eletrofloculação é simples de controlar e facilmente ampliável para realidades à escala comercial. É uma técnica com parco consumo energético e pouco dispendiosa do ponto de vista de investimento, distanciando-se pela positiva de técnicas como a centrifugação, a flotação com floculantes ou a sedimentação com floculantes (Poelman *et al.*, 1997).

Segundo Abdelaziz (2013B) se o processo for otimizado em termos de tempo e voltagem é possível atingir recuperações de biomassa superiores a 98%. A utilização de eletrocoagulação antes da centrifugação diminui drasticamente a energia necessária para a colheita, resultando em custos na ordem dos $\$0,19\text{kg}^{-1}$ ($0,15\text{€ kg}^{-1}$) de biomassa seca livre de cinzas. Algumas pesquisas têm demonstrado que os ânodos de alumínio são mais eficientes do que os de ferro (Vandamme *et al.*, 2011), permitindo concluir que o processo de eletro-coagulação-flotação é mais eficiente do que a centrifugação, nas condições ótimas (Abdelaziz *et al.*, 2013B).

Uma investigação realizada com *Nannochloropsis* sp. revelou que a eletrocoagulação pode atingir eficiências de recuperação de biomassa superiores a 97%, utilizando densidades de corrente de $8,3\text{mA.cm}^{-2}$ durante 10 minutos. A avaliação da biomassa mostrou que não existiam diferenças significativas na quantidade e qualidade dos ácidos gordos, nem dos pigmentos depois do tratamento com este método (Matos *et al.*, 2013). Também para *Chlorococcum* sp. e *Tetraselmis* sp. se atingiram eficiências de 99% e 98%, respetivamente (Uduman *et al.*, 2011).

Um estudo com uma cultura mista de *Scenedesmus acutus* e *Chlorella vulgaris*, produzidos em águas residuais, comparou a eficiência de recuperação da biomassa do floculante sulfato de alumínio com a da eletrocoagulação, concluindo que a segunda hipótese era mais eficiente por ser mais

económica e rápida, com a vantagem de haver menor probabilidade de contaminações com hidróxidos metálicos (Uduman *et al.*, 2011).

É importante ter em consideração que a concentração da microalga no meio e a fase de crescimento em que se encontra a cultura influencia a eficiência deste método (Matos *et al.*, 2013).

Assim, alguns investigadores sugerem que os métodos eletroquímicos podem ser seguros, rentáveis e ambientalmente sustentáveis (Abdelaziz *et al.*, 2013B).

1.3.3 Centrifugação

A centrifugação é um processo de separação entre sólidos e líquidos que utiliza a ação da força centrífuga para promover, de forma acelerada, a deposição das partículas suspensas num líquido. A centrifugação é a técnica mais utilizada em laboratório para realizar a colheita de microalgas por ser rápida e não necessitar de reagentes. Para além disso apresenta eficiências muito elevadas, cerca de 95 a 100% para centrifugações a 13000g e 80 a 90% de eficiência para centrifugações a 500-1000g (Abdelaziz *et al.*, 2013B). Contudo, possui vários inconvenientes como o elevado gasto energético de operação e em equipamento e a exposição das células a elevadas forças gravitacionais e de corte, que podem danificar a sua estrutura celular. Para aplicações em larga escala é um processo demasiado dispendioso, só se justificando para produtos de alto valor. Para espécies de microalgas marinhas não é economicamente viável porque a presença de sais aumenta a velocidade de corrosão dos materiais (Pires *et al.*, 2012).

A título de exemplo, uma centrífuga consegue fazer a colheita de um tanque de microalgas com 115m² e 0,3m de profundidade numa hora, no entanto é um processo energeticamente intensivo (8kWh.m⁻³). Se pensarmos numa densidade de algas de 0,02% p/p em peso seco, com um conteúdo em óleo de 30%, até obtermos uma pasta de 20% p/p, numa hora a centrífuga conseguiria fazer a colheita de 35000 litros, que renderiam 7kg de biomassa algal, que por sua vez conteriam 2,1kg de lípidos. Com uma extração/transesterificação com uma eficiência de 90% seriam obtidos 1,89kg de esteres metílicos de ácidos gordos (FAMES) que originariam 19,8kWh. No entanto, só a utilização da centrífuga consumiria 49kWh. Esta é a razão pela qual este tipo de processo está longe de ser sustentável (Abdelaziz *et al.*, 2013B).

1.4 Secagem

Depois da biomassa algal ser colhida é necessário proceder à sua secagem. Ao contrário do que sucede nas culturas energéticas terrestres, a secagem extensiva da biomassa algal é absolutamente necessária para a produção de biocombustíveis líquidos, como biodiesel, uma vez que a água iria inibir alguns dos processos seguintes, nomeadamente a extração de lípidos e a transesterificação (Lam & Lee, 2012).

Do ponto de vista ambiental e energético a secagem com recurso à energia solar seria o melhor método, no entanto este não é sempre aplicável para regiões temperadas devido à limitada luz solar em alguns períodos do ano. Nessas situações é necessário recorrer à utilização de energia elétrica, ou diretamente a combustíveis fósseis, para secar a biomassa e assegurar a produção contínua para cada ciclo da cultura. Um estudo de LCA recorreu à utilização de gás natural para secar a biomassa algal. A necessidade de utilizar esse combustível fóssil conduziu a um balanço energético negativo na produção de microalgas para biocombustíveis, podendo consumir cerca de 70% da energia total do processo produtivo (Sander & Murth, 2010).

1.4.1 Em estufa

A secagem em estufa consiste na exposição a um fluxo contínuo de ar quente do material a secar, do qual a água se evapora. Laboratorialmente a secagem em estufa é o método mais simples para obter biomassa algal seca (Ratti, 2001). De um modo geral a biomassa é deixada a secar na estufa entre os 70 e os 100°C, em função do que se pretende valorizar, durante 12 a 24 horas (Ferreira *et al.*, 2013; Jácome-Pilcoa *et al.*, 2009).

1.4.2 Em liofilizador

Na secagem por liofilização obtém-se biomassa algal seca sem se perderem as propriedades intrínsecas originais. Este método tem a vantagem adicional de tornar as paredes das células mais porosas, pela formação de cristais de gelo no seu interior, que ao quebrarem as paredes melhoram a extração de produtos intracelulares. A liofilização consiste em congelar as amostras abaixo do ponto supercrítico e submetê-las depois a baixas pressões (1kPa) e temperaturas (-40°C), permitindo que os cristais de gelo sublimem. Em larga escala este método é apenas utilizado para produtos de elevado valor, uma vez que é um processo moroso e energeticamente dispendioso, consumindo cerca de 4 a 8 vezes mais do que a secagem convencional (Lee *et al.*, 2012; Ratti, 2001).

1.4.3 Em secador solar

A secagem de biomassa algal recorrendo à energia solar está dependente das condições climáticas. Por um lado, a elevada temperatura a que a biomassa é sujeita e, por outro, o alto teor de humidade que a biomassa apresenta podem conduzir a uma decomposição da mesma durante a secagem ao sol. A utilização da energia solar para a secagem em larga escala só poderá ser utilizada quando houver mais *know-how* nesta tecnologia (Lee *et al.*, 2012).

O Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG) concebeu um protótipo de secador solar, SECMA, com uma capacidade para 0,28m³ e uma superfície de coletor solar de 0,8m². Este protótipo permite secar cerca de 1 a 2 kg de biomassa microalgal passando de um conteúdo em humidade de 85% para 5%, em 3 a 4 horas. Adicionalmente pode operar com uma pequena ventoinha de 20W para forçar a ventilação de ar (Ferreira *et al.*, 2014).

1.5 Rutura celular

Após a secagem da biomassa algal é necessário proceder à rutura celular para melhor se proceder à extração dos compostos que se pretende valorizar. Muitas vezes a rutura e a extração estão associadas, dependendo do tipo de processo. Os métodos utilizados para fazer a rutura celular são físicos, químicos ou enzimáticos, mas são muito específicos por se tratar de organismos muito pequenos e com parede celular. As técnicas físicas incluem o congelamento e descongelamento, a moagem, a liofilização seguida de moagem, a prensagem e os ultrassons. Os processos químicos incluem a utilização de detergentes, de solventes, de agentes quelantes, a extração supercrítica com CO₂. O uso de enzimas que degradem a parede celular está em desenvolvimento e não é, ainda, economicamente viável (Lee *et al.*, 2012; Parmar *et al.*, 2011). Na Figura 1.3 apresenta-se os vários métodos de rutura organizados por tipo.

A rutura das células para a posterior extração de lípidos das microalgas é um processo mais complexo do que a extração de lípidos das culturas energéticas terrestres. Isto deve-se ao tamanho dos organismos e à presença de uma parede celular espessa que dificulta a libertação do conteúdo intracelular, tornando a prensagem mecânica, o método mais comum para as oleaginosas, muito mais difícil de aplicar (Lam & Lee, 2012).



Figura 1.3 – Classificação dos processos de ruptura celular aplicáveis a microalgas (adaptado de Lee *et al.*, 2012)

Os métodos mecânicos de ruptura são os mais utilizados porque a sua eficiência está menos dependente da espécie de microalga e conduzem a menores contaminações dos compostos extraídos. Contudo, do ponto de vista energético, estes métodos são mais exigentes do que os métodos químicos e enzimáticos. A ruptura celular é um passo particularmente importante porque irá condicionar o rendimento em biodiesel. A utilização de moinho de bolas causa danos diretos nas células, baseado na alta velocidade das bolas metálicas, e é um método que tem sido bem-sucedido quer a nível laboratorial, quer a nível industrial. No entanto, a eficiência dos métodos está dependente das espécies de microalgas (Amaro *et al.*, 2011).

1.6 Extração

Para o processo de extração de óleos utilizam-se maioritariamente métodos químicos, sobretudo o solvente hexano, fluidos supercríticos (CO₂ ou metano). Este processo utiliza apenas uma pequena parte (5 a 10%) da energia total necessária à produção de biocombustíveis a partir de microalgas (Sander & Murth, 2010).

1.6.1 Com solventes químicos

A extração de lípidos com solventes é o método mais comum para biomassa microalgal, comumente designado método Soxhlet. Isto deve-se ao solvente químico ter elevada seletividade e solubilidade com os lípidos, pelo que mesmo os lípidos intracelulares conseguem ser extraídos por difusão, através da parede celular. O solvente mais usado é o n-hexano, mas também se utilizam outros como o metanol, o etanol e uma mistura de metanol com clorofórmio. Porém, esta técnica apresenta diversas desvantagens já que os solventes são altamente tóxicos, à exceção do etanol que pode ser obtido de fontes renováveis, e não são sustentáveis uma vez que derivam de combustíveis fósseis (Lam & Lee, 2012).

1.6.2 Acelerada por solvente

A extração acelerada por solvente (ASE) é uma técnica com cerca de 20 anos e genericamente é a aplicação de solventes orgânicos, à pressão e temperatura abaixo do seu ponto de ebulição, com o intuito de extrair lípidos e pigmentos. Esta técnica assemelha-se à normal extração por solventes químicos, pelo método Soxhlet. Os solventes utilizados são os mesmos e a biomassa seca é também colocada num cartucho e depois submetida ao fluido extrator a temperaturas elevadas (50 a 200°C). A

extração é realizada por curtos períodos de tempo, cerca de 5 a 10 minutos a uma pressão entre 34 e 204atm. Posteriormente é usado um gás comprimido, co-solvente, para remover o extrato da amostra para um outro recipiente (Cooney *et al.*, 2009).

Na maioria dos casos esta técnica é eficiente, se todos os parâmetros de operação forem otimizados. Apresenta como vantagem, comparativamente ao método anterior, a rapidez da extração e a menor quantidade de solvente. No entanto, os solventes continuam a ser tóxicos e de origens não renováveis (Cooney *et al.*, 2009).

Um estudo para otimizar esta técnica na extração de antioxidantes da *Spirulina platensis* demonstrou que o etanol era o solvente mais eficiente no processo (entre hexano, éter de petróleo, etanol e água). Concluíram também que o parâmetro com maior influência é a temperatura de extração, sendo o tempo o parâmetro menos relevante (Herrero, *et al.*, 2005).

1.6.3 Com CO₂ supercrítico

O princípio básico da extração com fluidos supercríticos é atingir uma determinada fase (supercrítica), que está para além do ponto crítico de um fluido, na qual a separação das fases líquida e gasosa desaparece, ficando apenas uma única fase homogênea (Sawangkeaw *et al.*, 2010).

Na fase supercrítica as propriedades termofísicas, tais como a densidade, viscosidade, difusividade mudam drasticamente, em função da temperatura e pressão. Como resultado, as alterações destas propriedades transformam o fluido num super-solvente, melhorando a eficiência de extração. Podem ser utilizados diversos fluidos supercríticos, mas o CO₂ é, de longe, aquele que tem despertado maior interesse para a extração de produtos fármacos e relacionados com microalgas (Lam & Lee, 2012).

Várias são as vantagens do uso de CO₂ supercrítico face aos outros solventes químicos: não é tóxico, não proporciona um ambiente oxidativo, evitando a degradação dos extratos, possui baixa temperatura crítica (cerca de 31°C), evitando a degradação térmica dos produtos, tem elevada difusividade e baixa tensão superficial, permitindo a penetração em poros mais pequenos, e fácil separação do CO₂ à temperatura ambiente após a extração. Para a extração supercrítica não é necessário que a biomassa esteja seca, podendo ser utilizada sob a forma de pasta, com a vantagem de ser até mais eficiente desta forma. Isto deve-se ao facto do CO₂ supercrítico ser um solvente não polar e a presença de água atuar como um co-solvente polar natural, facilitando a extração dos lípidos polares e melhorando o rendimento da extração de lípidos. A principal desvantagem apresentada por este método é o elevado custo de operação (Lam & Lee, 2012; Amaro *et al.*, 2011).

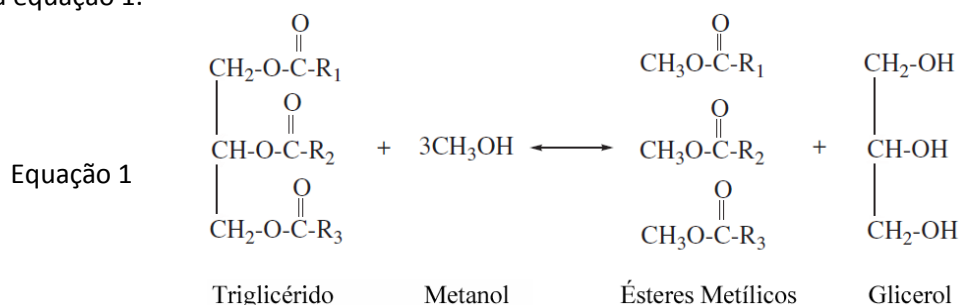
Segundo um estudo efetuado por Nobre *et al.* (2013) em *Nannochloropsis* sp., a extração com CO₂ supercrítico foi mais eficiente, originando maior rendimento em lípidos e pigmentos do que utilizando o método Soxhlet quer com solvente n-hexano quer com etanol.

1.7 Transesterificação

A transesterificação é o processo através do qual os óleos ou gorduras de origem vegetal ou animal são transformados em biodiesel, ou seja, numa mistura de ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME). Estas gorduras são compostas por 90 a 98% de triglicéridos, alguns mono- e diglicéridos e ácidos gordos livres, para além de uma quantidade residual de fosfolípidos, carotenóides, tocoferóis, água e compostos de enxofre (Amaro *et al.*, 2011).

A reação de transesterificação ocorre em várias etapas que incluem hidrólises reversíveis em série, em que os triglicéridos são convertidos em diglicéridos e estes em monoglicéridos, com obtenção de ésteres de ácidos gordos em cada uma das etapas (Amaro *et al.*, 2011; Ehimen *et al.*, 2010).

No processo de transesterificação parte-se, assim, de triglicéridos que por reação com um álcool de cadeia curta (normalmente o metanol) originam ésteres metílicos e glicerol, outro álcool, de acordo com a equação 1.



Embora a estequiometria molar entre álcool e gordura seja 3:1, o rácio molar geralmente utilizado é de 6:1 para desviar o equilíbrio da reação no sentido da produção de FAME. A relação entre a massa de matéria-prima inicial e a de biodiesel final é próxima de 1:1 (Amaro *et al.*, 2011; Rawat *et al.*, 2011).

De modo a acelerar a reação, são utilizados catalisadores homogéneos ou heterogéneos, que por sua vez podem ser básicos ou ácidos. Industrialmente a transesterificação é realizada recorrendo à catálise homogénea básica com KOH ou NaOH, por originar maior rentabilidade. No entanto, para matérias-primas com elevada acidez (mais de 0,5% em peso seco), como é o caso de alguns óleos sintetizados por microalgas, é necessário recorrer a um catalisador ácido (ex: H₂SO₄), uma vez que os ácidos gordos livres tendem a reagir com o catalisador básico, formando sabões. A saponificação leva a menores rentabilidades de biodiesel e dificulta a separação entre o biodiesel e o glicerol, um coproduto que também pode ser valorizado. Este processo de esterificação/transesterificação pode ser conduzido em duas fases: inicialmente os óleos são sujeitos a catálise ácida, permitindo que os ácidos gordos livres sejam convertidos em ésteres alquílicos e, posteriormente, o catalisador básico é adicionado de modo a obter melhores resultados na transesterificação. Este processo em dois passos foi já testado com sucesso para algumas matérias-primas e pode ser facilmente reproduzido à escala industrial, apresentando contudo a desvantagem de utilizar mais catalisador básico do que o necessário para o processo, de modo a neutralizar o catalisador ácido, o que resulta num custo acrescido para a produção de biodiesel (Lam & Lee, 2012).

A utilização de catalisadores heterogéneos apresenta como grande vantagem a reutilização dos mesmos, uma vez que no final do processo o catalisador pode ser facilmente recuperado por filtração, o que diminui também o gasto de água com os ciclos de purificação do produto, necessários para os catalisadores homogéneos. Os catalisadores heterogéneos têm como desvantagem precisarem de mais tempo de reação para se obter rentabilidades próximas das dos homogéneos. O óxido de cálcio (CaO) é o catalisador heterogéneo mais comum e foi recentemente testado com a microalga *Nannochloropsis oculata*. No entanto, elevados rendimentos foram apenas obtidos quando o CaO foi suportado pelo Al₂O₃, por este último aumentar a força do catalisador. Existe ainda pouca investigação sobre a transesterificação de óleos de microalga com catalisadores heterogéneos (Lam & Lee, 2012).

Se o processo de transesterificação for conduzido com fluidos supercríticos, como metanol ou etanol, em condições de pressão e temperatura acima do ponto crítico, não são necessários catalisadores (Amaro *et al.*, 2011).

Existem, neste momento, poucos estudos sobre a otimização da conversão em biodiesel dos óleos das microalgas, sendo que a rentabilidade da reação depende muito de fatores como a concentração do catalisador, o álcool utilizado (metanol ou etanol), a proporção molar entre álcool e óleo, a temperatura, a agitação e o tempo de reação (Lam & Lee, 2012).

1.7.1 Transesterificação direta ou *in-situ*

A transesterificação *in-situ* é um processo simplificado por permitir que a extração do óleo e a sua transesterificação ocorram em simultâneo. Desta forma a biomassa contacta diretamente com o álcool, na presença do catalisador, reduzindo-se o tempo de reação. Os rendimentos de conversão podem ser superiores a 90%, mas a biomassa algal a utilizar deve conter pouca humidade. O uso de biomassa algal como uma pasta húmida tende a originar conversões negligenciáveis em biodiesel (Lam & Lee, 2012).

Na transesterificação direta o aumento da temperatura e do volume de álcool aumenta o rendimento das conversões em ésteres metílicos. Também a agitação do reator tem influência positiva na taxa de formação de biodiesel (Ehimen *et al.*, 2010).

Uma equipa de investigadores comparou diferentes solventes para extração de lípidos e posterior transesterificação, com a transesterificação direta em *Chlorella pyrenoidosa*. Concluiu que a mistura de clorofórmio:metanol (2:1 v/v) era a que originava melhores resultados para a extração de lípidos, enquanto o hexano conduzia aos resultados mais baixos. No entanto para a conversão em ésteres metílicos o metanol por si só obteve os resultados mais elevados. A extração e conversão com metanol também obteve melhores resultados do que a transesterificação direta com metanol (D'Oca *et al.*, 2011).

1.8 Biocombustíveis e outros compostos de valor comercial

Encontrar um fornecimento suficiente de energia “limpa” para garantir serviços energéticos à sociedade é uma tarefa árdua e está ligada à estabilidade global, à prosperidade económica e à qualidade de vida. Estas relações dão origem a questões de debate acerca da escolha de novos combustíveis produzidos a partir de novas matérias-primas, para complementar ou substituir a rede energética baseada em combustíveis fósseis.

De acordo com a Agência Internacional de Energia a procura energética irá aumentar, possivelmente em 40% até 2030. A utilização de combustíveis líquidos triplicou entre 2000 e 2007 e os biocombustíveis contribuem em 10% para o fornecimento global de energia, mas constituem apenas 1,5% dos utilizados em transportes (Malcata, 2011). Presentemente são consumidos mundialmente 15 terawatts de energia por ano, dos quais apenas 7,8% provêm de fontes de energia renovável (Jones e Mayfield, 2012).

A Associação Europeia de Biomassa Algal estimou que poderá levar mais 10 a 15 anos para transformar experiências laboratoriais em produção à escala industrial de biocombustíveis a partir de microalgas (Milledge, 2011).

Existem quatro principais tipos de biocombustíveis comerciais (Jones e Mayfield, 2012, Dermibas, 2011):

- (i) Biodiesel, obtido por transesterificação, ou outros bioóleos obtidos por via termoquímica (gasificação e pirólise), a partir de culturas oleaginosas e materiais lenhocelulósicos;
- (ii) Bioetanol e biobutanol, obtidos via sacarificação e fermentação de açúcares de culturas ricas em amido e biomassa lenhocelulósica, mas também autotroficamente por microalgas;

- (iii) Biogás, obtido por digestão anaeróbia de resíduos agrícolas ou animais, ou biomassa lenhocelulósica;
- (iv) Biohidrogénio, obtido via fermentativa de biomassa algal ou lenhocelulósica em processos anaeróbicos e autotroficamente por microalgas.

Os biocombustíveis referidos acima, à exceção do biodiesel, ainda apresentam questões ao nível da segurança de armazenamento e transporte. Os bioálcoois requerem destilação para a sua concentração o que limita a energia libertada, além de serem moléculas higroscópicas, deteriorando-se com relativa facilidade.

Embora as quantidades de biodiesel, obtido a partir de sementes de oleaginosas, e de bioetanol, a partir de cana-de-açúcar (biocombustíveis de 1ª geração), tenham vindo a aumentar, a sua produção em larga escala não é sustentável. Estes biocombustíveis podem ser misturados com os combustíveis fósseis numa dada percentagem, mas não será possível nem sustentável substituir toda a rede baseada em combustíveis fósseis por biocombustíveis de 1ª geração, a nível dos transportes (Chisti, 2007).

Uma resposta possível para a substituição dos combustíveis líquidos de origem fóssil para os transportes é utilizar as mesmas fontes que deram origem aos combustíveis provenientes do petróleo: microrganismos fotossintéticos, produzindo bioóleos (Jones e Mayfield, 2012).

Um valor realista para a produção de biomassa algal situa-se entre 15 e 25 toneladas.ha⁻¹.ano⁻¹. Sem otimizar as condições de crescimento e assumindo que os microorganismos possuem 30% de lípidos no seu peso seco, isto seria equivalente a uma produção de óleos de 4,5 a 7,5 toneladas.ha⁻¹.ano⁻¹. Contudo, para além do elevado conteúdo lipídico, muitas espécies de microalgas contêm também hidratos de carbono que podem ser usados como substrato para fermentação, para obter bioetanol. Como adicionalmente estes microorganismos fixam o CO₂ atmosférico ou o CO₂ proveniente de gases de combustão para o seu crescimento à medida que captam a energia solar, posicionam-se de forma promissora como matéria-prima para a produção de diversos biocombustíveis. Estes combustíveis derivados de microalgas estão entre os biocombustíveis de terceira geração, possibilitando uma nova dimensão na indústria das energias renováveis (Lam & Lee, 2012).

1.8.1 Biodiesel

Muitas espécies de microalgas podem produzir grandes quantidades de lípidos como produtos de reserva. Estes lípidos podem ser retirados pelos métodos de extração referidos anteriormente e seguidamente, por transesterificação, ser convertidos em biodiesel. Este processo ainda não é economicamente viável quando comparado com a utilização direta de combustíveis com base no petróleo, mas o facto da restante biomassa algal que não foi utilizada poder ser ainda processada para produção de bioetanol e biofertilizantes é um contributo para viabilizar a utilização de microalgas para a produção de biodiesel (Jones e Mayfield, 2012; Gallagher, 2011; Parmar *et al.*, 2011).

Apesar de todas as dificuldades a biomassa algal parece ser a única fonte renovável de biodiesel capaz de fazer face à procura mundial de combustíveis para os transportes (Demirbas, 2010). Segundo o mesmo autor (Demirbas, 2011), uma das técnicas mais promissoras é a produção de bioóleos (produto substituto do gasóleo) a partir de microalgas e sujeitar a biomassa a uma liquefação hidrotérmica, técnica semelhante à pirólise, mas na qual existe um agente oxidante que é a água.

Para poder ser comercializado, o biodiesel tem de obedecer a uma série de parâmetros analíticos (Tabela 1.5) conforme consta da norma europeia de qualidade para biodiesel, EN14214.

Tabela 1.5 – Alguns parâmetros de qualidade do biodiesel descritos na EN 14214

Parâmetro	Limite da EN 14214	Método de ensaio
Ésteres metílicos	≥ 96,5 % (m/m)	EN 14103
Éster metílico do ácido linolénico	≤ 12 % (m/m)	EN 14103
Ésteres metílicos com mais de 4 insaturações	≤ 1 % (m/m)	EN 15779
Índice de acidez	≤ 0,5mg KOH/g	EN 14104
Índice de iodo	≤ 120g I ₂ /100 g	EN 14111
Viscosidade cinemática a 40°C	3,5 a 5,0mm ² /s	EN ISO 3675
Densidade a 15°C	860 a 900kg/m ³	EN ISO 3675/EN ISO 12185
Conteúdo em água	500mg/kg	EN ISO 12937

1.8.2 Bioetanol

A biomassa algal apresenta elevado potencial para a produção de bioetanol devido ao seu alto teor em açúcares, sob a forma de polissacarídeos (na parede celular e em amido) e baixo conteúdo em lenhina e hemiceluloses, comparativamente às plantas superiores (Jones & Mayfield, 2012). A produção de microalgas apresenta a grande vantagem de não competir com a produção alimentar, situação que não acontece com as outras matérias-primas de 1ª geração usadas para a produção de bioetanol, caso da cana-de-açúcar, do milho ou da beterraba sacarina. Por outro lado, as matérias-primas de 2ª geração, como a madeira e as palhas de arroz e de milho, são biomassa lenhocelulósica e, como tal, têm de sofrer pré-tratamentos severos para quebrar a estrutura complexa da lenhina e diminuir a fração de celulose cristalina, convertendo-a em celulose amorfa, para poderem ser usadas para a produção de bioetanol. Esses pré-tratamentos necessitam de muita energia e têm impactos negativos no ambiente. As microalgas têm a vantagem de não conterem lenhina, mas muitos dos hidratos de carbono encontram-se na parede celular o que significa que são necessários pré-tratamentos, como extrusão ou corte mecânico, para conseguir libertar esses açúcares e convertê-los em açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol (Lam & Lee, 2012).

Na Tabela 1.6 encontra-se o conteúdo em hidratos de carbono de várias espécies de microalgas.

Para a produção de bioetanol a partir de microalgas, a biomassa é fermentada utilizando leveduras que a convertem em etanol hidratado, sofrendo este depois uma desidratação para se obter o bioetanol (Suali & Sarbatly, 2012). O bioetanol pode também ser produzido diretamente a partir de microalgas, é o caso da *Synechocystis* sp. PCC 6803, uma cianobactéria geneticamente modificada, que tem a capacidade de converter cataliticamente energia solar, água e CO₂ em bioetanol (DEMA Consortium, 2012).

Tabela 1.6 – Conteúdo em hidratos de carbono de algumas microalgas (Batista *et al.*, 2014; Singh & Gu, 2010; Hirano *et al.*, 1997)

Espécie de Microalga	Hidratos de carbono (% ps)
<i>Anabaena cylindrica</i>	25–30
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	26
<i>Chlorella vulgaris</i>	12–37
<i>Dunaliella salina</i>	32
<i>Euglena gracilis</i>	14–18
<i>Porphyridium cruentum</i>	40–57
<i>Scenedesmus obliquus</i>	10–31
<i>Spirogyra</i> sp.	33–64
<i>Spirulina platensis</i>	8–14
<i>Tetraselmis maculata</i>	15

Não existe, no entanto, muita informação sobre a produção de bioetanol a partir de microalgas. Dado haver um maior interesse na produção de biodiesel a partir de microalgas por estas possuírem

naturalmente elevadas quantidades de lípidos e por o biodiesel possuir um poder calorífico superior ao bioetanol (Lam & Lee, 2012).

A produção simultânea de biodiesel e bioetanol é possível e nessa situação a extração de lípidos é realizada antes do processo fermentativo. Este conceito foi estudado extraíndo os lípidos com CO₂ supercrítico a 60°C e sujeitando posteriormente a biomassa a fermentação pela levedura *Saccharomyces bayanus*. A utilização de CO₂ como método de extração de lípidos origina posteriormente concentrações muito superiores de etanol, porque atua como um pré-tratamento ao quebrar a parede celular das microalgas, libertando o conteúdo em lípidos mas também em hidratos de carbono. Esta possibilidade de reduzir o processo a um passo torna mais viável a produção à escala comercial de biocombustíveis a partir de microalgas (Lam & Lee, 2012; Harun *et al.* 2010).

Algumas das espécies de microalgas mais promissoras para a produção de bioetanol são a *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*, *Spirogyra* e *Spirulina* por ser possível induzi-las a produzir mais de 50%, em peso seco, de amido e glicogénio utilizável como matéria-prima para a produção de bioetanol (John *et al.*, 2011). Entre as macroalgas destacam-se alguns géneros como a *Laminaria*, *Saccorhiza* e *Alaria*, pertencentes às algas castanhas e cujas principais reservas são laminarina e manitol e a *Gelidium amansii*, pertencente às algas vermelhas cujas reservas são a celulose, glucano e galactano (John *et al.*, 2011).

1.8.3 Biogás

A produção de biogás a partir da biomassa algal passa por submeter essa biomassa a uma fermentação anaeróbia que é catalisada por bactérias, leveduras ou fungos. As microalgas são ricas em hidratos de carbono e proteínas que servem de fonte de carbono na fermentação. A fermentação anaeróbia é um processo que precisa de nutrientes, de ausência de oxigénio, a temperatura e pH adequados. O biogás obtido é uma mistura de metano (55 a 75%) e CO₂ (25 a 45%) e pode ser utilizado assim ou purificado de modo a ser obtido só metano. O biometano pode ser utilizado diretamente como biocombustível gasoso ou para gerar eletricidade, enquanto a restante biomassa é utilizada para produzir biofertilizantes (Jones & Mayfield, 2012; Rawat *et al.*, 2011).

1.8.4 Biohidrogénio

Algumas microalgas fotossintéticas são capazes de produzir diretamente biohidrogénio através da fotofermentação em processos anaeróbicos que envolvem a oxidação da ferredoxina pela enzima hidrogenase. No entanto, este processo não é simples por envolver competição com uma série de outros processos metabólicos. A recente investigação nesta área foca-se essencialmente em encontrar uma hidrogenase robusta que compita com os outros processos e seja muito eficiente na produção de biohidrogénio, razão pela qual este processo ainda está longe da viabilidade comercial (Jones & Mayfield, 2012; Parmar *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2011).

A alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* tem a capacidade de produzir hidrogénio por hidrólise da água durante o período de luz e consegue também produzir biohidrogénio em condições de anaerobiose. Certas cianobactérias também podem constituir uma boa fonte de produção de hidrogénio que, por comparação com a produção de hidrogénio por eletrólise utilizando a energia fotovoltaica, apresenta um custo claramente inferior, cerca de 7 vezes menos, 18€/m³ para 125€/m³, (Rawat *et al.*, 2013).

Um estudo realizado com a cianobactéria *Anabaena* sp., capaz de produzir hidrogénio fotoautotroficamente, concluiu que seria possível produzir hidrogénio adicional, no final do ciclo

utilizando a biomassa da microalga como substrato para a fermentação por *Enterobacter aerogenes* (Ferreira *et al.*, 2013).

Em alternativa, a produção de biohidrogénio pode ser alcançada somente através da fermentação dos açúcares presentes na biomassa algal, por bactérias fermentativas. A *Enterobacter aerogenes* é uma bactéria anaeróbia facultativa que pode ser utilizada para produzir hidrogénio por fermentação no escuro. Estudos comprovam que se obtêm rendimentos superiores em biohidrogénio com biomassa algal húmida o que é muito positivo, dado que um dos pontos mais exigentes energeticamente é a secagem da biomassa algal. A *Clostridium butyricum*, bactéria anaeróbia obrigatória, é capaz de produzir maiores quantidades de biohidrogénio por comparação com a *E. aerogenes* utilizando a biomassa de *Scenedesmus obliquus*. No entanto, por ser um processo mais moroso (48h) e por necessitar de condições anóxicas para crescer e produzir H₂, origina custos de operação e manutenção mais elevados, que não justificam a diferença de produtividade (Batista *et al.*, 2014).

Também as macroalgas, como *Gelidium amansii* e *Laminaria japonica*, têm elevado potencial como fontes de biomassa para a produção de biohidrogénio a partir da fermentação anaeróbia (Jones & Mayfield, 2012).

Outra opção para a obtenção de hidrogénio a partir de microalgas é sujeitar a biomassa a uma pirólise ou gasificação. Em qualquer dos casos, o rendimento em biohidrogénio aumenta com a temperatura. Segundo um estudo com *C. fracta* e *C. protothecoides*, o rendimento em BioH₂ aumentou de 25,8% para 44,4% e de 27,6% para 48,7% em volume, respetivamente, no processo de pirólise e com um aumento de temperatura de 375°C para 650°C. No caso da gasificação, o rendimento em BioH₂ aumentou de 26,3% para 54,7% e de 28,1% para 57,6% em volume, respetivamente, com um aumento de temperatura de 550°C para 950°C (Dermibas, 2011).

1.8.5 Outros compostos com valor comercial, produzidos por microalgas

Como já foi referido anteriormente a biomassa algal tem o potencial de fornecer energia renovável através da produção de diferentes vetores energéticos (biodiesel, bioetanol, biohidrogénio e biogás). Adicionalmente estes microorganismos têm a capacidade de sintetizar moléculas bioativas como carotenóides, ácidos gordos, enzimas, antioxidantes, anti-inflamatórios, vitaminas e outros compostos orgânicos de elevado valor que podem ser usados na alimentação, na cosmética, na indústria farmacêutica, na produção de biomateriais e nanoestruturas (Ferreira *et al.*, 2013; Jin & Melis, 2003). Este facto torna o conceito de biorrefinaria aplicado às microalgas algo muito mais viável.

Atualmente existem diversas aplicações comerciais para microalgas, dominadas pelas seguintes estirpes: *Spirulina* (*Arthrospira*), *Chlorella*, *Dunaliella salina* e *Aphanizomenon flos-aquae*.

As microalgas podem ser utilizadas na alimentação humana e animal devido à sua composição química, com elevado teor em proteínas (Tabela 1.7), mas também por serem uma fonte de quase todas as vitaminas essenciais (ex: A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, E, biotina, ácido fólico, ácido pantoténico, nicotinato) assim como ricas em pigmentos como clorofilas (0,5 a 1% do peso seco), carotenóides (0,1 a 0,2% do peso seco em média, mas podendo atingir os 3% em astaxantina na *Haematococcus* e 14% em β-caroteno na *Dunaliella*) e ficobilinas (Milledge, 2011; Spolaore *et al.*, 2006; Dufossé *et al.*, 2005).

A *Spirulina* é extensamente utilizada na alimentação animal tendo sido provado o seu efeito a nível fisiológico (aumento da fertilidade e resposta imunitária devido ao fornecimento de um grande leque de vitaminas, minerais e ácidos gordos essenciais) e aparência externa (pele saudável e pelo lustroso) dos animais (Milledge, 2011).

Por outro lado desenvolvem um papel crucial em aquicultura por serem alimento direto para moluscos, crustáceos e peixes juvenis. Neste caso, os géneros mais utilizadas são *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema* e *Thalassiosira* (Milledge, 2011; Spolaore *et al.*, 2006).

Atualmente tem havido um interesse crescente e o aumento da investigação de moléculas de elevado valor acrescentado a partir de microalgas, tais como os Ácidos Gordos Poli-insaturados (PUFA), utilizados em suplementos nutricionais e alimentação infantil, os pigmentos, como β -caroteno, astaxantina, mas também a luteína, zeaxantina, e o licopeno, como corantes alimentares, anti-oxidantes e anti-inflamatórios.

Na produção de compostos de elevado valor as espécies com maior impacto são *Haematococcus pluvialis* para a astaxantina, a *Dunaliella bardawil* e *Dunaliella salina* para o β -caroteno e *Cryptocodinium cohnii* para o DHA (ácido docosa-hexaenóico – ácido gordo do tipo ómega-3). Adicionalmente a estes bioprodutos, a luteína de *Muriellipsia* sp. e a zeaxantina de *Dunaliella salina* estão a ser considerados para aplicações comerciais (Milledge, 2011; Spolaore *et al.*, 2006; Jin & Melis, 2003).

1.8.5.1 Pigmentos e Antioxidantes

As microalgas e cianobactérias são capazes de produzir uma quantidade significativa de pigmentos diferentes (Tabela 1.8).

Existem três principais classes de pigmentos: Clorofilas, Carotenóides e Ficobilinas.

As clorofilas são pigmentos esverdeados, insolúveis em água e os quelatos mais importantes na natureza por terem a capacidade de transformar a energia proveniente do sol em energia química, através da fotossíntese. São caracterizadas por possuírem um anel de porfirina, que tem a capacidade de receber e doar eletrões, possibilitando a captura da energia solar.

Os carotenóides são pigmentos geralmente de cor laranja, amarela ou vermelha e pela sua estrutura não se dissolvem em água nem têm a capacidade de transformar diretamente a energia solar em energia química, tendo de transferir a energia absorvida às clorofilas. Por esta razão são chamados pigmentos acessórios. Podem ser divididos em dois grupos: carotenos e xantofilas; os primeiros são compostos somente por carbono e hidrogénio, já as xantofilas contêm também oxigénio. Os carotenóides apresentam muitas vezes propriedades antioxidantes (Jin & Melis, 2003).

As ficobilinas são pigmentos de coloração intensa que podem apresentar diversas cores, de azul a vermelho e que existem apenas em cianobactérias e em algas vermelhas (Rhodophyta). São especialmente eficientes a absorver os comprimentos de onda vermelhos, laranjas, amarelos e verde-claro, que não são bem absorvidos pela clorofila *a*, são também considerados pigmentos acessórios. Estruturalmente são compostas por uma cadeia aberta de quatro anéis de pirrol que se encontra ligada a proteínas solúveis, ficobiliproteínas (Milledge, 2011; Spolaore *et al.*, 2006).

Tabela 1.7 – Conteúdo em proteínas de algumas microalgas (Singh & Gu, 2010)

Espécie de Microalga	Proteínas (% ps)
<i>Anabaena cylindrical</i>	43–56
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57
<i>Chlorella vulgaris</i>	51–58
<i>Dunaliella salina</i>	57
<i>Euglena gracilis</i>	39–61
<i>Porphyridium cruentum</i>	28–45
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50–56
<i>Spirogyra</i> sp	6–20
<i>Spirulina platensis</i>	52
<i>Tetraselmis maculata</i>	52

Tabela 1.8 – Alguns pigmentos produzidos por microalgas

Pigmento	Classificação	Cor	Aplicação	Exemplo de microalgas	Referência
Astaxantina	Carotenoide (Xantofila)	Avermelhado	Corante, antioxidante	<i>Haematococcus pluvialis</i> ; <i>Scenedesmus</i> sp.; <i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Chlorella sorokiniana</i> ; <i>Tetraselmis</i> sp.	Jaime et al., 2010; Abrahamsson et al., 2012; Gouveia et al., 1996; Pérez-López et al., 2014; Raman e Mohamad, 2012
α-caroteno	Carotenoide (Caroteno)	Laranja	Corante, antioxidante	<i>C. zofingiensis</i> ; <i>Dunaliella salina</i> ; <i>Scenedesmus</i> sp.	Cordero et al., 2012; Dufossé et al., 2005
β-caroteno	Carotenoide (Caroteno)	Laranja	Corante, antioxidante	<i>Dunaliella salina</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Scenedesmus almeriensis</i>	Spolaore et al., 2006; Gouveia et al., 1996; Macías-Sánchez et al., 2010
Cantaxantina	Carotenoide (Xantofila)	Vermelho	Corante, antioxidante	<i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Chlorella zofingiensis</i> ; <i>Dactylococcus dissociatus</i>	Cordero et al., 2012; Grama et al., 2014
Clorofila a	Clorofila	Verde-amarelado	Corante	<i>Tetraselmis suecica</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i> ;	Borghini et al., 2009; Seyfabadi et al., 2011
Clorofila b	Clorofila	Verde-azulado	Corante	<i>Tetraselmis suecica</i> ;	Borghini et al., 2009
Clorofila c	Clorofila	Verde	-	<i>Emiliania huxleyi</i> ;	Álvarez et al., 2012
Clorofila d	Clorofila	Verde	-	<i>Acaryochloris marina</i>	Kühl et al., 2005
Criptoxantina	Carotenoide (Xantofila)	Avermelhado	Corante, antioxidante	<i>Dunaliella salina</i> ; <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Dufossé et al., 2005; Inbaraj et al., 2006
Ficocianina	Ficobilinas	Azul	Corante, trat. de doenças oxidativas	<i>Porphyridium aeruginum</i> ; <i>Nostoc</i> sp.; <i>Spirulina platensis</i>	Dufossé et al., 2005; Reis, et al., 1998; Antelo et al., 2008
Ficoeritrina	Ficobilinas	Vermelho	Corante	<i>Porphyridium</i> sp.; <i>Nostoc</i> sp	Dufossé et al., 2005; Reis, et al., 1998
Fucoxantina	Carotenoide (Xantofila)	Verde-Acastanhado	Anti-inflamatório	<i>Tetraselmis suecica</i>	Borghini et al., 2009
Licopeno	Carotenoide (Caroteno)	Vermelho	Corante, antioxidante	<i>Chlorella zofingiensis</i>	Cordero et al., 2012
Luteína	Carotenoide (Xantofila)	Laranja-avermelhado	Corante, Antioxidante	<i>Scenedesmus almeriensis</i> ; <i>Chlorella pyrenoidosa</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Tetraselmis suecica</i>	Macías-Sánchez et al., 2010; Inbaraj et al., 2006; Gouveia et al., 1996; Borghini et al., 2009
Neoxantina	Carotenoide (Xantofila)	Laranja-avermelhado	-	<i>Scenedesmus</i> sp.; <i>Chlorella pyrenoidosa</i> ; <i>Haematococcus pluvialis</i> ; <i>Tetraselmis suecica</i>	Abrahamsson et al., 2012; Inbaraj et al., 2006; Jaime et al., 2010; Borghini et al., 2009
Riboflavina	Flavoproteína	Amarelo-alaranjado	Vitamina, Corante, Coenzima	<i>Chaetoceros gracilis</i> , <i>Thalassiosira pseudonana</i> ; <i>Isochrysis</i> sp.; <i>Pavlova lutheri</i> ; <i>Nannochloris atomus</i> ; <i>N. oculata</i>	Brown & Farmer, 1994
Violaxantina	Carotenoide (Xantofila)	Laranja	Corante	<i>Chlorella zofingiensis</i> ; <i>Chlorella pyrenoidosa</i> ; <i>Scenedesmus</i> sp.; <i>Dunaliella salina</i> ; <i>Haematococcus pluvialis</i> ; <i>Tetraselmis suecica</i>	Cordero et al., 2012; Inbaraj et al., 2006; Abrahamsson et al., 2012; Dufossé et al., 2005; Jaime et al., 2010; Borghini et al., 2009
Zeaxantina	Carotenoide (Xantofila)	Laranja-avermelhado	Corante	<i>Chlorella zofingiensis</i> ; <i>C. pyrenoidosa</i> ; <i>C. vulgaris</i> ; <i>Chlorella ellipsoidea</i> ; <i>Dunaliella salina</i> ; <i>Scenedesmus</i> sp.; <i>Tetraselmis suecica</i>	Cordero et al., 2012; Inbaraj et al., 2006; Gouveia et al., 1996; Koo et al., 2012; Jin & Melis, 2003; Abrahamsson et al., 2012; Borghini et al., 2009

As clorofilas, contrariamente aos carotenóides, não são considerados compostos com elevado valor porque são muito abundantes e podem ser extraídos com relativa facilidade de uma enorme variedade de espécies vegetais, para além de microalgas. Existem diversas estruturas de clorofila (*a*, *b*, *c*, *d*, *f*) no entanto, as mais abundantes são a *a* e *b* que se encontram nas plantas e maioria das algas e cianobactérias. Já as clorofilas *c* estão apenas referenciadas para algas, as *d* para cianobactérias e algas vermelhas e as *f* para comunidades de estromatólitos de cianobactérias (Li *et al.*, 2014; Álvarez *et al.*, 2012; Köhl *et al.*, 2005). A *Chlorella vulgaris* tem um dos mais elevados teores em clorofila encontrados na natureza (Seyfabadi *et al.*, 2011).

A fonte mais rica e natural de astaxantina é a microalga verde de água doce *Haematococcus pluvialis*, que pode conter até 3% de astaxantina em peso seco. Este pigmento é principalmente utilizado na indústria dos salmonídeos (salmão e truta) e dos crustáceos (ex., camarão, lagostins), no entanto, também é utilizado na indústria alimentar e cosmética pelas suas conhecidas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-tumorais (Pérez-López *et al.*, 2014; Milledge, 2011).

A utilização mais importante do β -caroteno é como corante alimentar, servindo também como suplemento de alimentação humana e animal. A produção comercial deste pigmento natural é sobretudo proveniente da *Dunaliella salina* e *D. bardawil* e pode ser bastante elevada, atingindo 14% de β -caroteno em peso seco, se as microalgas forem produzidas em condições de elevada salinidade e luz intensa. O β -caroteno natural e purificado comercializado é normalmente acompanhado pelos outros pigmentos da *Dunaliella*, predominantemente luteína, neoxantina, zeaxantina, violaxantina, criptoxantina e α -caroteno (Milledge, 2011; Dufossé *et al.*, 2005).

Um estudo *in vitro* e *in vivo* conduzido com *Spirulina* (*Arthrospira*) revelou a sua ação antioxidante, devido à presença de compostos como ácido fenólico, tocoferóis e β -caroteno nesta microalga, que são conhecidos por exibirem propriedades antioxidantes. Por outro lado proteção contra o cancro e o envelhecimento tem sido atribuída a compostos da bioativos *Spirulina*, mas a sua ação é mais evidente quando é utilizado todo o extrato da microalga em vez de apenas β -caroteno isoladamente. Isto mostra a possibilidade da existência de efeitos sinérgicos entre os compostos do extrato de *Spirulina* (Miranda *et al.*, 1998).

A produção e acumulação de cantaxantina na microalga *Dactylococcus dissociatus* é influenciada por vários fatores de stress. A forte intensidade da luz e a adição de NaCl conduziram a um aumento deste pigmento (Grama *et al.*, 2014). Em *Chlorella vulgaris* (Gouveia *et al.*, 1996), *Chlorella protetocoides* (Campenni' *et al.*, 2013) e *Chlorella zofingiensis* (Cordero *et al.*, 2012) as condições de crescimento sob stress, como forte irradiação e privação de azoto ou stress por NaCl, fomentam a passagem dos carotenóides primários, luteína e zeaxantina, a carotenóides secundários, como astaxantina e cantaxantina.

O pigmento cantaxantina é utilizado como corante alimentar em diversos países, nomeadamente na União Europeia e nos Estados Unidos da América, no entanto a sua utilização não foi aprovada na Austrália nem na Nova Zelândia. Por outro lado, a criptoxantina foi aprovada como corante alimentar nestes últimos dois países da Oceania, mas não na Europa ou EUA (Australia New Zeland, 2013; European Commission, 2013; U.S. FDA, 2011).

A luteína e a zeaxantina são conhecidas por possuírem um papel importante na manutenção da normal função da visão animal. A ingestão de luteína está relacionada com a diminuição do risco de cataratas e degradação retinal (relacionada com o envelhecimento). Por outro lado, estes pigmentos estão referenciados por terem propriedades preventivas contra o cancro (Koo *et al.*, 2012; Jin & Melis, 2003). A zeaxantina é usada como corante natural nas indústrias alimentar e cosmética. A microalga

Chlorella ellipsoidea apresenta níveis deste pigmento nove vezes superior à da pimenta vermelha, planta fonte de zeaxantina (Koo *et al.*, 2012).

Os pigmentos ficocianina e ficoeritrina são produzidos principalmente, a nível comercial, pela cianobactéria *Spirulina* e pela rodófito *Porphyridium*, respetivamente. A sua utilização é maioritariamente como corante alimentar natural, contudo, diversos estudos têm revelado as suas propriedades benéficas na saúde e aplicações farmacêuticas. Por outro lado, por estarem acopladas a proteínas, estas ficobiliproteínas apresentam características fluorescentes, sendo também usados em laboratórios de pesquisa imunológica (Antelo *et al.*, 2008; Spolaore *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 1998).

A riboflavina é uma vitamina essencial para os animais de aquicultura, sendo essencial que este composto seja fornecido na alimentação, já que os animais não são capazes de o produzir. A riboflavina no organismo adquire duas formas distintas que atuam como coenzimas em diversos processos de oxirredução. Existem diversas espécies de microalgas (*Chaetoceros gracilis*, *Thalassiosira pseudonana*, *Isochrysis* sp., *Pavlova lutheri*, *Nannochloris atomus*, *Nannochloropsis oculata*) utilizadas em aquicultura que são produzidas especificamente para alimentar, e assim fornecer esta vitamina, aos peixes ou a rotíferos (pequenos animais microscópicos) que entram na cadeia alimentar dos animais de aquicultura (Souto *et al.*, 2008; Brown & Farmer, 1994).

Diversos estudos foram conduzidos no sentido de utilizar os pigmentos das microalgas como corante de diferentes alimentos, com a vantagem de associar a essa coloração ácidos gordos essenciais e antioxidantes importantes. Gouveia e colaboradores (2006) utilizaram biomassa de *Chlorella vulgaris* e *Haematococcus pluvialis* para dar cor, entre verde e laranja, a maioneses e detetaram que as que continham microalgas eram mais resistentes à oxidação, tinham melhor consistência e apresentavam elevada estabilidade da cor. A incorporação de biomassa algal variou entre 0,05% e 2% (peso em peso) (Gouveia *et al.*, 2006). Outro estudo apenas com *Chlorella vulgaris* teve como objetivo colorir bolachas com diferentes tons de verde. Neste caso a concentração ideal de biomassa algal foi de 1% (peso em peso) e conduziu a melhor textura, com grande estabilidade da cor ao longo dos três meses de armazenamento das bolachas (Gouveia *et al.*, 2007). Também as massas (*pasta*) foram testadas com incorporação de biomassa de *Chlorella vulgaris* e *Spirulina maxima*, os resultados foram igualmente positivos, com a massa a tornar-se mais firme, a ter uma composição mais rica e a ser considerada mais apelativa pelo painel de prova (Fradique *et al.*, 2010).

Para uma extração eficiente de pigmentos, nomeadamente carotenóides, esta deve ser antecedida por pré-tratamentos da biomassa, de modo a que a percentagem de pigmentos extraídos seja elevada. Wiltshire e colaboradores (2000) testaram a adição de areia de quartzo e solvente para liofilizar a biomassa com posterior extração num banho de ultrassons durante 90 minutos a -4°C, para *Scenedesmus obliquus* e conseguiram extrair 90% dos pigmentos e ácidos gordos (Wiltshire *et al.*, 2000). Este método de um passo revelou-se fácil de aplicar, tendo conservado a relação quantitativa entre os diferentes pigmentos e os ácidos gordos, para além de não ter sido detetada qualquer degradação dos pigmentos. No entanto, a utilização de ultrassons não é um método aplicável em larga escala. Métodos como a autoclavagem ou a rutura mecânica por homogeneizadores de alta pressão resultaram na obtenção de três vezes mais astaxantina de *Haematococcus pluvialis*, do que a biomassa tratada com outros métodos (Grima *et al.*, 2003).

1.8.5.2 PUFAs

Os ácidos gordos poli-insaturados (PUFAs) são ácidos carboxílicos ligados a uma longa cadeia de hidrocarbonetos, que possui mais do que uma ligação dupla entre os carbonos. Os PUFA incluem os ácidos gordos essenciais ómega 3 (ω -3) e ómega 6 (ω -6). Estes, por sua vez, podem originar vários

compostos como o EPA (ácido eicosapentaenóico), DHA (ácido docosa-hexaenóico) ou o GLA (ácido gama-linolénico) (Burr *et al.*, 1932). Os ácidos gordos essenciais (AGE) são reconhecidos pelo seu valor terapêutico e efeito benéfico na saúde humana, nomeadamente ao nível das doenças crónicas e degenerativas. Frequentemente estes compostos são encontrados nos peixes e óleos de peixe, todavia, devido ao declínio dos *stocks* mundiais de peixe e ao aumento dos poluentes e toxinas nestes animais, tem havido uma procura por fontes alternativas de AGEs. As microalgas são uma fonte atrativa porque, entre outras razões, estes compostos se encontram naturalmente encapsulados, impedindo processos de oxidação. Estes microorganismos possuem principalmente EPA e DHA como fontes funcionais de ω -3. O EPA é reconhecido pelo seu efeito anti-inflamatório que previne os sintomas da artrite, pela sua influência no abaixamento do colesterol e contribuição para a saúde cardiovascular, assim como pelas suas propriedades neuro-protetoras (Pires *et al.*, 2012; Gouveia *et al.*, 2008). Atualmente o EPA é produzido para consumo humano a partir da microalga *Phaeodactylum tricornutum*, tendo o processo sido desenvolvido na Universidade de Almeria, em Espanha. A produção de EPA a partir de *Nannochloropsis* e da diatomácea *Nitzschia* encontra-se em estudo (Milledge, 2011).

Isochrysis galbana é outra microalga rica em PUFA, principalmente EPA. Gouveia e colaboradores (2008) incorporaram biomassa deste organismo em biscoitos, concluindo que o EPA não se degradava com a cozedura, para além de que os biscoitos apresentavam melhor textura e se tornavam mais atrativos devido à cor (Gouveia *et al.*, 2008). Outro ensaio de incorporação de biomassa algal na alimentação humana foi conduzido com *Isochrysis galbana* e *Diacronema vlkianum* para produção de massas (*pasta*). Neste ensaio concluiu-se que as massas enriquecidas com microalgas apresentavam um teor em EPA e DHA muito mais elevado do que a massa do controlo, provando a vantagem da integração de biomassa algal nestes alimentos do ponto de vista nutricional, mas também visual (Fradique *et al.*, 2013).

A microalga *Spirulina* (*Arthrospira*) é utilizada na alimentação humana devido ao seu elevado conteúdo proteico, por outro lado é também uma fonte valiosa do AGE ácido linolénico. O organismo humano é capaz de transformar o ácido alfa-linolénico (ALA), em DHA. O DHA é essencial para o desenvolvimento do sistema nervoso e funcionamento adequado do cérebro. Comercialmente o DHA de microalgas é extraído de *Cryptocodinium cohnii* e de *Schizochytrium* e depois integrado numa enorme variedade de preparados para bebés e suplementos alimentares (Milledge, 2011; Spolaore *et al.*, 2006).

Outra aplicação de produtos extraídos de microalgas, neste caso da diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* com alto teor em lípidos, foi a produção de uma nanofibra de gelatina com atividade antimicrobial contra *Escherichia coli* e multirresistente a *Staphylococcus aureus*. O objetivo com a obtenção desta nanofibra era utilizá-la como um material curativo ou penso (Kwak, *et al.*, 2014).

1.8.5.3 Bioplásticos e biopolímeros

Os plásticos são um material largamente utilizado pela sociedade nas mais variadíssimas atividades. No entanto, porque a sua origem é o petróleo e o seu fabrico prejudica o ambiente pela produção de resíduos e toxinas, contaminando o ar, as massas de água e os solos, levantam-se várias questões com a sua utilização. Por esta razão verificou-se um interesse crescente na utilização de compostos biodegradáveis e nas últimas duas décadas houve muita investigação nesta área, nomeadamente no que diz respeito à produção de bioplásticos por microorganismos (Zeller *et al.*, 2013).

Os bioplásticos podem ser definidos como plásticos produzidos a partir de fontes renováveis (base biológica) ou como plásticos que são biodegradáveis e/ou compostáveis. Estes materiais têm

suscitado particular interesse na indústria de embalagens, mas são também utilizados para utensílios de cozinha, recipientes alimentares e implantes ou próteses ortopédicas (Peelman *et al.*, 2013; Talukder *et al.*, 2012). Apesar da procura crescente por estes produtos, tal como por outros biomateriais, os bioplásticos têm uma participação no mercado relativamente baixa, uma estimativa refere 0,5% do consumo mundial de plásticos (Iles & Martin, 2013).

Como já referido as microalgas possuem elevada percentagem de proteínas na sua composição e outra alternativa, para além da alimentação animal e humana, é a sua utilização direta, ou seja a inclusão da biomassa algal com outros compostos de modo a obter biocompósitos e bioplásticos (Toro *et al.*, 2013).

Os bioplásticos podem ser produzidos a partir de diferentes compostos. O amido é um polissacarídeo amplamente disponível e um recurso natural facilmente biodegradável. É possível produzir um filme ou película plástica à base de amido desde que exista elevado teor de água ou plastificantes (glicerol, sorbitol). Estes materiais plastificados, que requerem a aplicação de energia térmica e mecânica, são denominados amido termoplástico (TPS) e constituem uma alternativa ao poliestireno (PS). Os materiais termoplásticos à base de amido têm sido aplicados com sucesso a nível industrial na formação de espumas, de filme de sopro e na moldagem por injeção e extrusão. A celulose é outro polissacarídeo muito disponível na natureza e a partir do qual é possível produzir filme de celofane. No entanto, devido à natureza hidrofílica do amido e da celulose, a sua aplicação é limitada pela vulnerabilidade à degradação e pela fragilidade e pouca resistência à humidade (Peelman *et al.*, 2013).

Existe uma tendência para a utilização crescente de plastificantes biodegradáveis que apresentam baixa toxicidade e boa compatibilidade com variados plásticos, resinas e borrachas. Estes biopolímeros podem apresentar diferentes composições (à base de açúcares, proteínas ou lípidos) e origens (Vieira *et al.*, 2011).

O ácido polilático (PLA) é um poliéster termoplástico biodegradável, feito a partir de materiais renováveis, e visto como um promissor substituto do polietileno de baixa e alta densidade (LDPE e HDPE), do poliestireno (PS) e politereftalato de etileno (PET). O PLA pode ser obtido a partir de qualquer fonte de hidratos de carbono, que é convertida em dextrose, posteriormente fermentada em ácido láctico e depois policondensada. Este composto pode ser moldado para variadas aplicações como suturas cirúrgicas e produtos de consumo descartáveis, mas apresenta limitações à utilização em embalagens alimentares pela sua permeabilidade ao oxigénio e humidade, instabilidade térmica e fragilidade (Peelman *et al.*, 2013; Talukder *et al.*, 2012).

Foi estudada a produção de ácido láctico e extração lipídica da biomassa algal de *Nannochloropsis salina*. O processo, desenvolvido com sucesso, consistiu em neutralizar os lípidos livres hidrolisados e usá-los como meio de fermentação para *Lactobacillus pentosus* para a produção de ácido láctico (Talukder *et al.*, 2012).

Os polihidroxialcanoatos (PHA) constituem uma família de polímeros termoplásticos biodegradáveis produzidos por uma grande variedade de microorganismos. Estes polímeros, com cerca de 0,2mm, são produzidos no citoplasma das células por um processo de fermentação e depois colhidos utilizando um solvente como o clorofórmio ou diclorometano. Existem mais de 100 PHAs, sendo o mais conhecido o polihidroxibutirato (PHB). Estes compostos têm a capacidade de substituir os polímeros convencionais, uma vez que possuem propriedades químicas e físicas semelhantes, no entanto, apresentam menor resistência a solventes e baixa resistência ao impacto (Laycock *et al.*, 2013; Peelman *et al.*, 2013). A acumulação de PHAs aumenta à medida que a proporção de

carbono/azoto aumenta, o que sugere que, tal como as reservas de polifosfatos e hidratos de carbono, a acumulação de PHA ocorre em resposta a um desequilíbrio no crescimento provocado pela limitação de nutrientes e abundância de fontes de carbono.

Segundo Sudesh e colaboradores (2000) um sistema de produção de PHA poderia ser conduzido com cianobactérias e microalgas uma vez que já se conseguiu introduzir nestes organismos a PHA sintetase, enzima responsável pela biossíntese de PHAs (Sudesh *et al.*, 2000).

O PHB é produzido naturalmente por bactérias como *Ralstonia eutropha* (Figura 1.4) e *Bacillus megaterium*. Uma equipa de investigadores conseguiu introduzir o caminho de síntese de PHB de *R. eutropha* na diatomácea *Phaeodactylum tricornutum*, demonstrando pela primeira vez que é possível produzir PHB num sistema microalgal. A expressão das enzimas bacterianas foi suficiente para originar níveis de 10,6% de PHB, em peso seco algal (Hempel *et al.*, 2011).

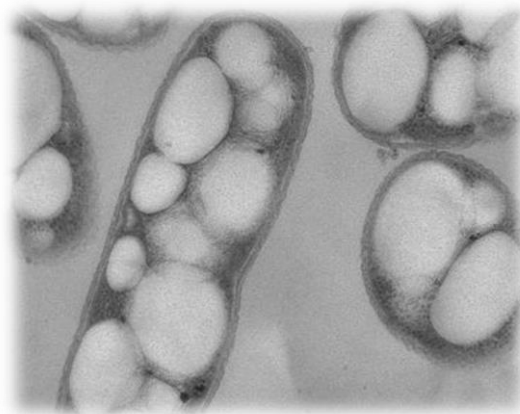


Figura 1.4 – PHB no interior de *Ralstonia eutropha* (Yu *et al.*, 2013)

Por outro lado, a degradação destes compostos em ambiente aquático pode ser realizada por bactérias e microalgas, que colonizam a estrutura e a decompõem rapidamente, em cerca de 30 dias (Lopez-Llorca *et al.*, 1994).

Zeller e colaboradores (2013) utilizaram um polímero de polietileno como modelo para desenvolver e caracterizar misturas de termoplásticos com algas. O estudo foi conduzido com *Chlorella* e *Spirulina*, no qual foram criadas misturas de biomassa algal com glicerol, com o intuito de obter biopolímeros. As algas manifestaram comportamentos diferentes, com a *Spirulina* a ser mais propícia às aplicações comerciais devido às suas propriedades ligantes com o polietileno. No entanto, a *Chlorella* demonstrou maior plasticidade o que poderá torná-la igualmente interessante noutras aplicações (Zeller *et al.*, 2013).

O aproveitamento dos resíduos da biomassa algal gerada na produção de biodiesel de 3ª geração como enchimento para a produção de biocompósitos foi investigado por Toro *et al.* (2013). A equipa testou a incorporação deste resíduo com polibutileno succinato (PBS) conseguindo uma substituição de 20 a 30% de PBS por resíduo de biomassa algal, o que constituiu uma alternativa competitiva.

1.9 Conceito de biorrefinaria

É essencial fazer uma abordagem sistemática à produção de microalgas de forma a integrar a produção de biocombustíveis e coprodutos. O conceito da biorrefinaria consiste na produção de uma ampla gama de biocombustíveis e produtos químicos a partir da biomassa algal, de modo a tornar a produção de biocombustíveis economicamente exequível (Ferreira *et al.*, 2013).

Segundo a Agência Internacional de Energia (IEA, 2008), a biorrefinaria foi definida como o processamento sustentável de biomassa num espectro de produtos comercializáveis e energia. Para aumentar a viabilidade de uma biorrefinaria à base de biomassa algal é necessário utilizar a maioria dos componentes celulares destes organismos (Silva *et al.*, 2013). Desta forma, a extração de

pigmentos pode ser seguida da produção de biodiesel, sendo a restante biomassa utilizada para produzir bioetanol, biohidrogénio ou biogás. Ao ser extraído mais do que um tipo de biocombustível da biomassa algal, bem como subprodutos, o valor desta aumenta consideravelmente (Jones & Mayfield, 2012). Ainda usando este conceito, pode ser produzida eletricidade com o biogás de forma a compensar a energia necessária à digestão anaeróbia para produção do próprio biogás. Além disso, pode obter-se energia térmica a partir da combustão da biomassa algal com o propósito final da obtenção de eletricidade. Resumindo, seja qual for a combinação escolhida neste conceito, o importante é contemplar a utilização e aproveitamento máximo de toda a biomassa e seus resíduos, bem como fechar o "circuito energético", utilizando a energia originada no processo de produção dos biocombustíveis (Chisti, 2007).

Faz assim mais sentido produzir microalgas de forma integrada. Deste modo, a produtividade é superior e o sistema torna-se mais sustentável e eficiente, sendo possível utilizar toda a biomassa destes organismos e processá-la consoante as suas características, originando menos desperdício e poluição (Figura 1.5) (Jones & Mayfield, 2012; Rawat *et al.*, 2011).

Os três aspetos que mais influenciam a sustentabilidade do processo de produção de biocombustíveis a partir de microalgas são o balanço de energia e carbono, os custos de produção e os impactos ambientais (Slade, 2012). De forma a tornar mais sustentável este processo e aumentar a viabilidade económica, para além da produção ser feita num conceito de biorrefinaria, as estruturas produtivas deverão ser implantadas junto de instalações fabris e zonas de tratamento de efluentes, beneficiando dos nutrientes e dispondo de CO₂ (Slade, 2012).

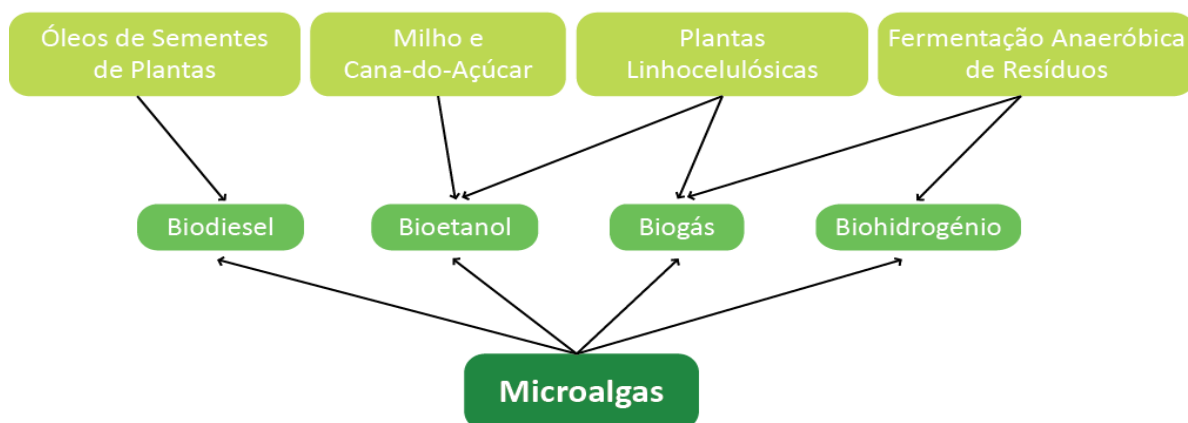


Figura 1.5 – Biocombustíveis que podem ser produzidos a partir de microalgas (adaptado de Jones & Mayfield, 2012)

O avanço tecnológico é também fundamental para a eficiência e otimização de todas as etapas da produção, pois aspetos como a energia consumida nos sistemas de cultivo, na colheita, na secagem e na extração são cruciais na análise económica (Jones & Mayfield, 2012).

Têm sido desenvolvidos diversos estudos laboratoriais e à escala piloto com produção de microalgas e a sua consequente utilização num conceito de biorrefinaria (Tabela 1.9). No entanto, a análise económica e a passagem destes estudos à escala industrial apresentam diversos constrangimentos. Um estudo recente com *Nannochloropsis* sp. analisou a possibilidade de produzir pigmentos de elevado valor, com posterior extração de óleos para produção de biodiesel e utilização final da restante biomassa para produzir biohidrogénio (Nobre *et al.*, 2013). Contudo, na vertente da análise económica são muitos os investigadores que concluem que este conceito ainda não é viável a

menos que se encontrem formas mais económicas de fazer a colheita e processamento da biomassa algal (Abdelaziz *et al.*, 2013B; Ferreira *et al.*, 2013; Soares *et al.*, 2013; Pires *et al.*, 2012).

Tabela 1.9 – Trabalhos experimentais com microalgas numa base de biorrefinaria (Silva *et al.*, 2013)

Biorrefinaria de microalgas								
Biodiesel	Bioetanol	Biogás	BioH ₂	Pigmentos	Farinha de algas	Glicerina	Bioeletri-cidade	Referência
X							X	Subhadra e Edwards (2010)
X				X				Campenni' <i>et al.</i> (2013); Liu <i>et al.</i> (2012); Mostafa <i>et al.</i> (2012)
X		X						Collet <i>et al.</i> (2011); Ehimen <i>et al.</i> (2011); Sialve <i>et al.</i> (2009)
X			X	X				Nobre <i>et al.</i> (2012)
	X	X						Kim <i>et al.</i> (2013)
X					X	X		Subhadra e Grinson-George (2011)
		X	X					Mussnug <i>et al.</i> (2010)
			X*					Ferreira <i>et al.</i> (2012)

*Produção de BioH₂ auto e heterotroficamente

2. Parte Experimental

2.1 Microalgas

Neste trabalho foram utilizadas as seguintes microalgas: *Chlorella vulgaris* (INETI 58, LNEG_UB, Portugal) (Cv); *Scenedesmus obliquus* (ACOI 204/07, Universidade de Coimbra - Algoteca, Portugal) (Sc) e o Consórcio C (*Cons. C*), isolado da água residual.

Para o isolamento do Consórcio C a água residual foi filtrada utilizando microfibras de vidro (Whatman, EUA) e resuspendida em meio sintético Bristol (Starr & Zeikus, 1993). Foram recolhidas amostras diárias para observação microscópica, tendo os Erlenmeyers com a cultura sido incubados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com luminosidade de $100\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ e agitação de 130rpm.

O consórcio isolado incluía diferentes espécies de microalgas entre elas *Chlorella*, *Chaetophora*, *Scenedesmus* e *Navicula* (Figura 2.1).

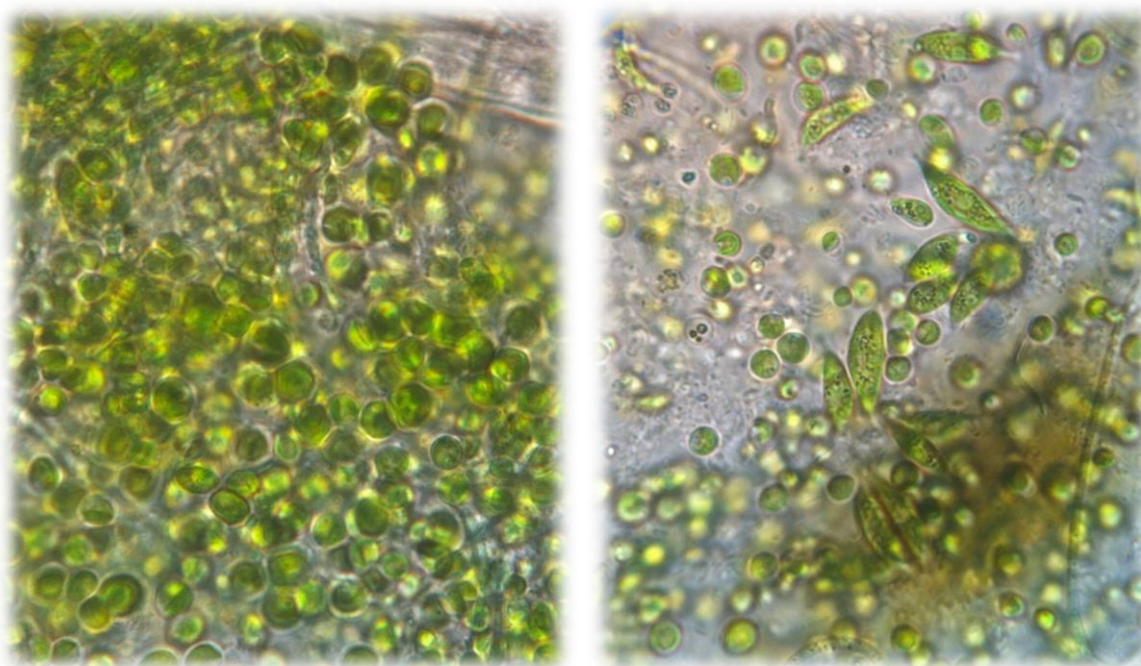


Figura 2.1 – Observação microscópica das microalgas do Consórcio C

As microalgas (Cv, Sc e *Cons. C*), antes da inoculação, foram cultivadas em reatores cilíndricos de 10L com meio Bristol (Starr & Zeikus, 1993), a 25°C , com luz contínua de $100\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ (medida com um Phywe Lux-Meter) e agitado com ar comprimido filtrado, a uma taxa de fluxo de 1vvm.

2.2 Efluente residual

Os meios de cultura utilizados no fotobiorreator, onde foram conduzidas as experiências, provieram de águas residuais urbanas das Águas da Figueira (AdF, Figueira da Foz, PT), recolhidas depois do tratamento primário.

Durante as experiências, que decorreram entre agosto de 2013 e julho de 2014, foram recolhidas águas residuais em julho, outubro e novembro de 2013 e março e junho de 2014, que serviram para alimentar o biorreator (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Datas das alimentações e respectivos volumes introduzidos no fotobiorreator, para cada uma das experiências

	Alimentações	
	Data	Volume
Efluente de julho (<i>Chlorella vulgaris</i>)	-	-
Efluente de outubro (<i>Scenedesmus obliquus</i>)	Dia 8	50L
	Dia 37	70L
	Dia 47	60L
Efluente de novembro (Consórcio C)	Dia 57	50L
	Dia 62	75L
	Dia 72	60L
	Dia 83	50L
	Dia 93	55L
Efluente de março (<i>Chlorella vulgaris</i>)	Dia 21	60L
	Dia 29	50L
	Dia 34	60L
Efluente de junho (<i>Scenedesmus obliquus</i>)	Dia 9	60L
	Dia 16	75L
	Dia 21	60L

2.3 Fotobiorreator

As experiências decorreram no polo do LNEG em Alfragide, Lisboa (38°43'54,3"N, 9°12'41,3"W), tendo sido utilizado um protótipo vertical de fotobiorreator (PBR) de 150L (Figura 2.2).

O PBR operou no exterior, com um compressor de ar para efetuar a agitação, um módulo de membrana para permear a água residual tratada e um decantador para concentrar a biomassa (Graça *et al.*, 2014). Existia ainda um local para as sondas (pH, O₂ dissolvido, CO₂ dissolvido, temperatura, irradiação luminosa). O PBR, composto por 12 tubos de polimetacrilato de metilo (acrílico) dispostos verticalmente, com 10cm de diâmetro e 200cm de altura, operou em modo *batch* e semi-contínuo.

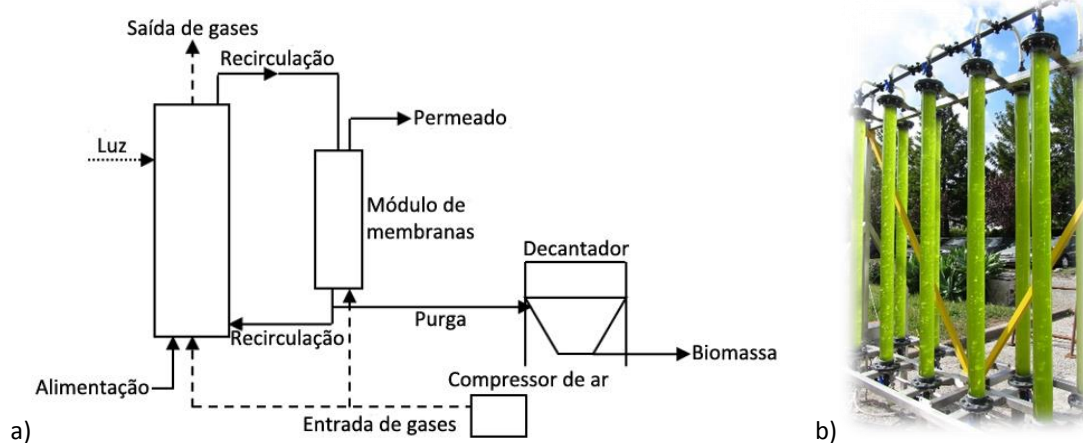


Figura 2.2 – Fotobiorreator de 150L: a) esquema simplificado e b) fotografia (adaptado de Graça *et al.*, 2014)

Os ensaios no PBR foram conduzidos com água residual depois do tratamento primário (≈240L) e sem adição de qualquer suplemento. As três microalgas (*Cv*, *Sc*, *Cons. C*) foram testadas e as inoculações foram efetuadas de forma semelhante. O volume de inóculo de microalga utilizado foi

calculado de modo a ser obtida uma concentração inicial no PBR próxima de 0,3 de densidade ótica a 540nm. Quando os níveis de nutrientes no meio de cultura do PBR se encontravam abaixo do preconizado por lei a cultura era colhida, cerca de 30L, juntamente com o permeado (depois de passar pelas membranas) outros 30L, e nova alimentação era realizada ao PBR (60L).

Quando se pretendeu induzir *stress* nas culturas de microalgas, estas foram deixadas no PBR depois de terem esgotado os nutrientes da água residual. O tempo de permanência no PBR sem nutrientes variou de ensaio para ensaio e encontra-se explicitado na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Nº de dias que as culturas de microalgas estiveram sob *stress* nutritivo

	<i>C. vulgaris</i> (1ª experiência)	<i>S. obliquus</i> (1ª experiência)	Consórcio C	<i>C. vulgaris</i> (2ª experiência)	<i>S. obliquus</i> (2ª experiência)
Nº de dias em <i>stress</i>	0	7	24	13	12

2.4 Produção das microalgas no fotobiorreator com água residual

O crescimento algal foi monitorizado diariamente assim como a evolução dos nutrientes na água residual. Para isso foram recolhidas amostras do PBR para avaliar o pH, os níveis de amónia, nitratos, fósforo e CQO. A leitura da densidade ótica a 540nm (DO_{540}) era efetuada utilizando um espectrofotómetro JASCO V-530 (as amostras eram diluídas convenientemente para garantir que os valores da densidade ótica se encontravam dentro do intervalo 0,1 – 1) e o peso seco livre de cinzas (PSLC) por filtragem de um volume conhecido de amostra através de um filtro Whatman GF/C45µm (Figura 2.3).



Figura 2.3 – Procedimentos para a determinação do peso seco

Os parâmetros da cultura como pH, O_2 dissolvido, temperatura do ar e irradiação solar foram monitorizados durante os ensaios através de sondas. A agitação de ar e o fluxo de recirculação eram controlados manualmente.

A temperatura média do ar e a insolação média mensal, durante o período das experiências, oscilaram consideravelmente ao longo dos meses e encontram-se na Tabela 2.3 (IPMA, 2014).

Tabela 2.3 - Temperatura média do ar e a insolação média mensal durante os ensaios (IPMA, 2014)

	<i>C. vulgaris</i> (1ª experiência)	<i>S. obliquus</i> (1ª experiência)	Consórcio C	<i>C. vulgaris</i> (2ª experiência)	<i>S. obliquus</i> (2ª experiência)
Temperatura média do ar	23°C	18°C	11°C	16°C	20°C
Insolação média mensal	350h	225h	160h	250h	310h

A colheita das microalgas foi realizada sem floculação, deixando a cultura depositar e depois centrifugando a 10000rpm (Avanti J25, Beckman) durante 10 minutos, Figura 2.4. Foi também testada a eletrocoagulação cujo procedimento se explica no ponto 4.1.6. A secagem foi realizada numa estufa a 70°C. No entanto, foram também testados outros dois métodos: liofilização (com um liofilizador Heto PowerDry LL3000) e secagem em secador solar (SECMAD, LNEG). Os consumos elétricos dos aparelhos (estufa, centrífuga e liofilizador) foram medidos com um medidor de energia elétrica (Paget Trading Modell 9149) durante o seu funcionamento, de modo a determinar o consumo efetivo de cada um dos processos.

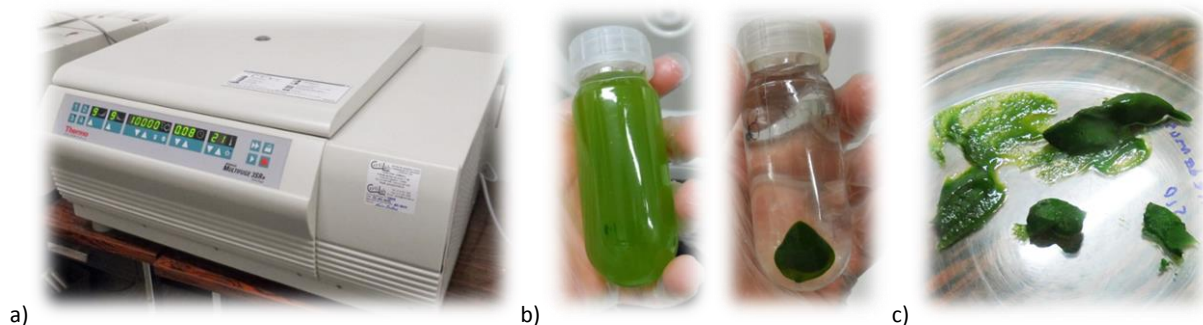


Figura 2.4 – Centrifugação das microalgas: a) centrífuga, b) amostra por centrifugar e centrifugada, c) recolha

2.5 Procedimentos de análise para o efluente e sobrenadante

As águas residuais urbanas das Águas da Figueira, utilizadas como meio de cultura das microalgas, foram analisadas e caracterizadas em termos de pH, ião amónio, nitratos, fósforo e CQO.

A medição de pH foi feita usando um eletrodo de pH (Crison), para a medição do ião amónio, (NH_4^+) foi utilizado um Eletrodo Seletivo de Iões NH_4 (Crison),

A determinação de nitratos (NO_3^-) foi realizada pelo método "Nitrate Cell Test 1.14542" (*kits* de teste Spectroquant Merck) usando um espectrofotómetro HACH DR/2010. Para o fósforo usaram-se *kits* comerciais Phosver 3 (ácido ascórbico) em comprimidos em pó para leitura no espectrofotómetro (HACH DR/2010).

A carência química de oxigénio (CQO) foi determinada com *kits* de Hach Lange, Hach 21258-51 (0 a 150mg.L⁻¹ CQO). Uma amostra de 2mL previamente filtrada, com um filtro de 0,22µm (Millipore), e diluída foi misturada com a solução de reação num tubo de ensaio e aquecida durante duas horas a 150°C num termobloco. Depois de arrefecer até à temperatura ambiente o tubo de ensaio foi introduzido no espectrofotómetro (HACH DR/2010) e a leitura efetuada a 620nm. Os resultados de CQO (mg.L⁻¹) são definidos como os miligramas de O_2 consumido por litro de amostra sob as condições desde procedimento.

O sobrenadante, depois de recuperada a biomassa, foi sujeito às mesmas análises (azoto, fósforo e CQO) realizadas para o efluente, que foram conduzidas de forma similar de modo a avaliar a eficiência do tratamento.

2.6 Ensaio de eletrocoagulação (EC)

Para o ensaio de eletrocoagulação (EC) utilizou-se a microalga *Scenedesmus obliquus* que tinha sido recolhida no 13.º dia de cultivo.

Testaram-se três intensidades diferentes de corrente elétrica (0,2A, 0,3A e 0,4A), três tempos de operação (2min, 4min e 6min) e a utilização de dois elétrodos de alumínio de 2 ou de 3cm de largura, que resultaram numa área de contacto com a cultura de 20cm² e 36cm², respetivamente. Os elétrodos tinham 1mm de espessura.

Os elétrodos de alumínio, no processo de EC, consistiam em dois retângulos de alumínio dispostos paralelamente, distando entre si 1cm e ligados a uma fonte de alimentação externa de corrente contínua (DC), modelo HY3005D, MASTECH®. Todos os ensaios foram realizados em recipientes de vidro de 500mL preenchidos com 400mL de cultura e, durante o processo, a suspensão de microalgas esteve em constante agitação a 100rpm (modelo HEIDOLFH), utilizando um agitador magnético, Figura 2.5.

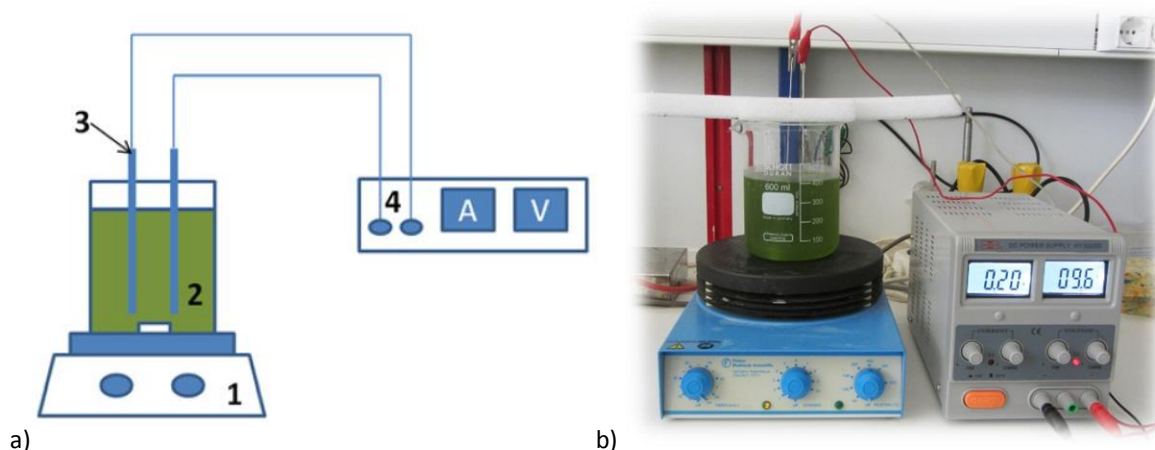


Figura 2.5 – a) Diagrama esquemático do sistema de eletrocoagulação (1- agitador magnético, 2- cultura da microalga, 3- elétrodos de alumínio e 4- fonte de energia DC) b) fotografia do sistema

Para a determinação da eficiência de recuperação da biomassa algal foram recolhidas amostras de 1mL logo abaixo da camada de algas floculada à superfície, 1 minuto depois do processo de EC ter sido interrompido. Estas amostras foram retiradas de forma cuidadosa de modo a não perturbar a suspensão. Seguidamente, a densidade ótica foi medida a 540nm (num espectrofotómetro UV-VIS Hitachi-2000) e comparada com a densidade ótica da cultura antes do processo de eletrocoagulação, de acordo com a equação 2:

$$\text{Equação 2} \quad \text{Eficiência de recuperação da biomassa (\%)} = \frac{D.O._i - D.O._f}{D.O._i} \times 100$$

Onde D.O._i é a densidade ótica da suspensão antes do tratamento de EC e D.O._f é a densidade ótica da suspensão após o tratamento de EC.

Depois do processo de eletrocoagulação os flocos de microalgas tenderam a juntar-se à superfície do meio. Esta biomassa foi recolhida para ser centrifugada e posteriormente seca em estufa ou num secador solar.

2.7 Caracterização da biomassa microalgal

Para a caracterização da composição da biomassa microalgal em termos de conteúdo em lípidos e pigmentos, esta foi previamente seca, moída num moinho de café e posteriormente num moinho de bolas (Retsch - modelo MM400) (Figura 2.6), durante 4 minutos a uma velocidade de $25s^{-1}$.



Figura 2.6 – a) Moinho de bolas (Retsch), b) amostra intacta e amostra moída

De vários pré-tratamentos testados aquele que originou maior recuperação de lípidos foi a utilização de moinho de café (para homogeneizar a amostra) seguida de moinho de bolas (para partir as células) (Gouveia *et al.*, 2014).

2.7.1 Conteúdo em Lípidos

A extração de lípidos foi conduzida num aparelho de Soxhlet durante seis horas, utilizando cerca de 1g de biomassa (após pré-tratamento) e n-hexano como solvente. A quantidade total de lípidos foi determinada gravimetricamente. Neste método a biomassa é colocada num cartucho (Whatman – *cellulose extraction thimbles*) que é depois introduzido num extrator Soxhlet, na base do qual é colocado um balão de fundo redondo com cerca de 170ml de n-hexano. Estas estruturas de vidro são colocadas na manta de aquecimento que está adaptada a um refrigerante de bolas (Figura 2.7). No final da extração, o solvente contendo o óleo é filtrado para um balão de evaporação, previamente tarado, que é depois levado ao Rotavapor (BÜCHI-R-200), para separar o solvente do óleo (Figura 2.7). No final, o balão contendo o óleo esteve 1 hora na estufa a $103^{\circ}C$, de modo a evaporar quaisquer vestígios de solvente, após o que foi pesado.

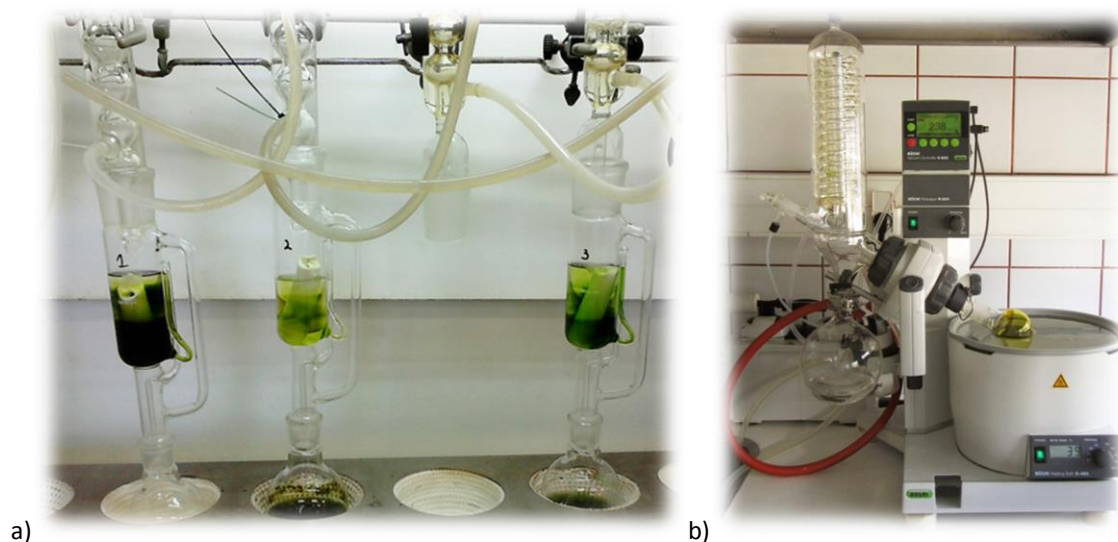


Figura 2.7 – a) Extração de óleos em Soxhlet, b) separação do solvente dos óleos, no Rotavapor

2.7.1.1 Hidrólise ácida

O procedimento da hidrólise ácida da biomassa permite contabilizar a quantidade total de óleo presente na biomassa microalgal e assim avaliar o grau de eficiência dos pré-tratamentos, nomeadamente do moinho de bolas.

Para a hidrólise ácida utilizou-se cerca de 1g de biomassa seca à qual se adicionaram 40mL de HCl (4N), tendo a mistura reagido durante 1 hora a 150°C num BLOC DIGEST 20. Depois de arrefecer, o conteúdo foi vertido para um filtro e lavado com água destilada até a água de lavagem ter atingido pH neutro, Figura 2.8.

Posteriormente, o filtro foi deixado a secar, sendo depois introduzido num cartucho para ser submetido à extração Soxhlet. A determinação da quantidade de óleo obtido foi feita gravimetricamente.



Figura 2.8 – Hidrólise Ácida: a) amostras e aparelho de digestão em funcionamento, b) filtração

2.7.2 Caracterização da Fração Lipídica

2.7.2.1 Composição em Ácidos Gordos

A composição da fração lipídica em termos de ácidos gordos foi determinada por cromatografia gasosa (GC). Os ésteres metílicos de ácidos gordos foram preparados com base na EN ISO 5509 (método do trifluoreto de boro – Anexo 1) (EN ISO 5509:2000). Colocou-se uma pequena porção da amostra obtida anteriormente num balão de destilação de 50mL, ao qual se adicionaram reguladores de ebulição (cerca de 10 esferas de vidro) e 4mL de solução metanólica de NaOH (2mL de NaOH em 100mL de metanol). Instalou-se o balão de destilação, ligado ao suporte e à refrigeração, e colocou-se num banho termostaticado a 80°C durante 6 minutos e, seguidamente, adicionaram-se 5mL de trifluoreto de boro. Três minutos depois juntaram-se 3mL de iso-octano e retirou-se o balão do banho. Acrescentaram-se 40mL de solução saturada de NaCl e agitou-se fortemente durante 15 segundos. Após a separação das fases transferiu-se a camada superior para um tubo de ensaio, fazendo-a passar por sulfato de sódio anidro.

As amostras obtidas foram analisadas por cromatografia gasosa usando um CP-3800 GC (Varian, USA) equipado com uma coluna capilar de 30m SUPELCOWAX 10 (0,32mm de diâmetro interno e 0,25µm de espessura). As temperaturas do injetor (split 1:50) e detetor (*flame ionization detector*) foram mantidas constantes a 250°C. A temperatura do forno foi programada para começar a 220°C

durante 16 minutos, aumentado $20^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ até aos 230°C e mantendo-se nesta temperatura durante 4 minutos. O gás de arrasto, hélio, foi mantido a uma taxa constante de $1,2\text{mL}.\text{min}^{-1}$.

A composição dos ácidos gordos foi calculada como uma percentagem dos ácidos gordos totais presentes na amostra, determinada pelas áreas dos picos, de acordo com a Norma Europeia EN 14103 (EN 14103:2003).

2.7.2.2 Conteúdo de matéria saponificável

O conteúdo em ésteres metílicos foi determinado após preparação da amostra pelo método do trifluoreto de boro, descrito no ponto 2.7.2.1, tendo-se adicionado à amostra a analisar heptadecanoato de metilo, como padrão interno. A equação 3 permitiu a contabilização da percentagem de ésteres metílicos que é possível obter a partir da matéria saponificável presente na fração lipídica da biomassa microalgal.

$$\text{Equação 3} \quad \% \text{ Ésteres Metílicos} = \frac{\frac{\varepsilon A - A_{P.I.}}{A_{P.I.}} \times m_{P.I.} \times \frac{V_{\text{iso-octano}}}{V_A}}{m_{\text{microalga}}} \times 100$$

Onde εA é o somatório das áreas, $A_{P.I.}$ é a área do padrão interno, $m_{P.I.}$ é a massa do padrão interno, V_{clor} corresponde ao volume de iso-octano adicionado, V_A é o volume de iso-octano final e $m_{\text{microalga}}$ é a massa de microalga utilizada.

2.7.2.3 Índice de acidez

A determinação da acidez dos óleos obtidos foi realizada seguindo a norma NP EN ISO 660 (2002). Para isso adicionou-se num Erlenmeyer uma amostra de óleo e a mistura dissolvente (em volumes iguais de éter e etanol) previamente neutralizada com solução 0,01N de hidróxido de potássio (KOH) na presença de solução alcoólica de fenolftaleína, como indicador.

Titulou-se com solução de KOH 0,01N até aparecer uma cor rosada persistente e verificou-se a normalidade do KOH. O Índice de Acidez é calculado pela equação 4:

$$\text{Equação 4} \quad \text{Índice de Acidez (mg KOH/g)} = \frac{V_{\text{KOH}} \times N \times M_{\text{KOH}}}{m_{\text{óleo}}}$$

Onde V_{KOH} é o volume da solução de KOH gasta (em mL), N é a normalidade da solução de KOH, M_{KOH} é a massa molar de KOH e $m_{\text{óleo}}$ corresponde à massa da amostra de óleo.

2.7.2.4 Índice de iodo

O índice de iodo, parâmetro que permite avaliar o grau de insaturação de um óleo (ou biodiesel) pode ser calculado teoricamente utilizando os seguintes fatores de multiplicação para os ésteres metílicos de ácidos gordos insaturados (Tabela 2.4), de acordo com a EN 16300 (2013).

O índice de iodo pode ser também determinado na prática, segundo a norma europeia EN 14111 (2003), e permite estabelecer o grau de insaturação de misturas de ésteres metílicos de ácidos gordos, tal como quando calculado teoricamente.

A cerca de 0,15g de biomassa algal adicionaram-se 20mL de solvente (ciclohexano e ácido acético em partes iguais) e posteriormente 25mL de solução de Wijs. O recipiente foi tapado e colocado no escuro durante uma hora. Acrescentaram-se 20mL de solução de iodeto de potássio (10g de KI em 100ml de H_2O) e 150mL de água. Titulou-se, sempre com agitação, com solução de tiosulfato

de sódio 0,1N até a solução adquirir uma tonalidade amarela. Juntaram-se umas gotas de solução de cozimento de amido como indicador (0,5g de amido em 103mL de água) e continuou-se a titulação até a solução ficar com uma cor branca acinzentada, próxima do ensaio em branco.

O índice de iodo da amostra é dado pela equação seguinte (Eq. 5):

$$\text{Equação 5} \quad \text{Índice de Iodo (g I}_2\text{/100g)} = \frac{(V_B - V_A) \times C \times 12,69}{m}$$

Onde: V_B é o volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação do ensaio em branco (mL); V_A é o volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra (mL); C é a concentração do tiosulfato de sódio (N); m é a massa da amostra (g).

Tabela 2.4 – Ésteres metílicos e respectivos fatores de multiplicação (EN 16300, 2013)

Ésteres metílicos de ácidos gordos insaturados		Fator de multiplicação
Tetradecanoato de metilo	(C14:1)	1,056
Hexadecanoato de metilo	(C16:1)	0,950
Heptadecenoato de metilo	(C17:1)	0,899
Octadecanoato de metilo	(C18:1)	0,860
Octadecadienoato de metilo	(C18:2)	1,732
Octadecatrienoato de metilo	(C18:3)	2,616
Eicosenoato de metilo	(C20:1)	0,782
Eicosadienoico de metilo	(C20:2)	1,574
Eicosatrienoico de metilo	(C20:3)	2,376
Docosenoato de metilo	(C22:1)	0,720
Docosadienoico de metilo	(C22:2)	1,448
Docosatrienoico de metilo	(C22:3)	2,184

2.7.3 Conteúdo em Açúcares

A extração de açúcares da biomassa algal foi realizada adicionando ácido sulfúrico (H_2SO_4 - 2N) a 0,5g de biomassa seca e autoclavando por 60 minutos a 121°C. Posteriormente a amostra foi filtrada por um filtro de 0,2 μm , ver Figura 2.9. Este método foi otimizado por Miranda e colaboradores (2012) para a extração de açúcares da biomassa de microalgas, uma vez que o método original foi otimizado para a extração de materiais lenhocelulósicos (Miranda *et al.*, 2012; Hoeblér *et al.*, 1989).

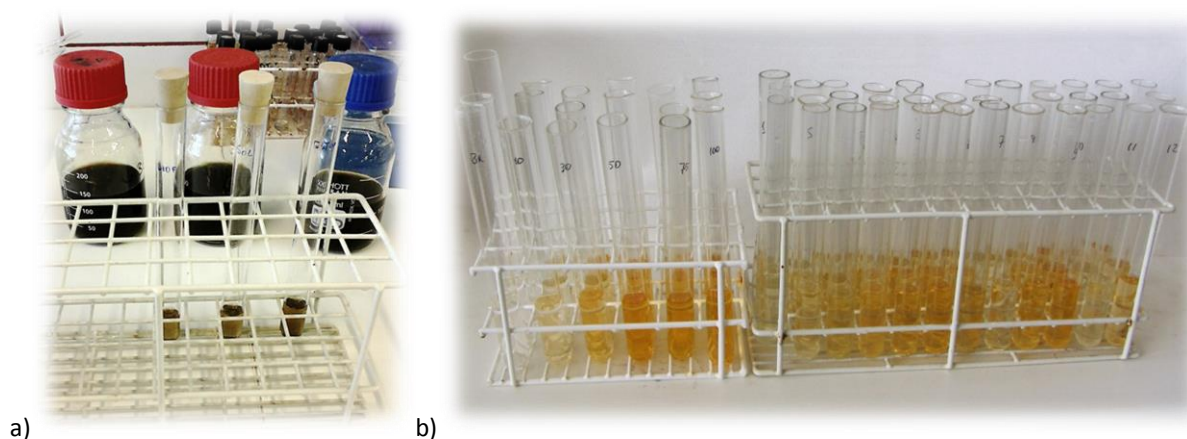


Figura 2.9 – Extração e determinação dos açúcares totais

O conteúdo total em açúcares foi determinado pelo método do reagente fenol-sulfúrico (DuBois *et al.*, 1956). A 1mL de amostra, previamente diluída (1:20), foi adicionado um 1mL de solução de fenol

(5% p/v) e 5mL de ácido sulfúrico a 96%. Repousou por 10 minutos à temperatura ambiente e por 15 minutos num banho de água fria. Foi agitado num agitador de vortex e lido num espectrofotómetro a 490nm (Figura 3.9). Foi preparada uma curva de calibração usando padrões de glucose e os resultados dos hidratos de carbono totais nas amostras de microalgas foram expressos em termos de equivalentes em glucose (Eq. 6):

$$\text{Equação 6} \quad [glucose] = (\text{declive da reta} \times A_{490} + \text{interceção}) \times \text{fator de diluição}$$

$$r^2 = 0.9947$$

A_{490} é a absorvância a 490nm e a concentração de glucose é expressa em $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

2.7.4 Conteúdo em Proteínas

O azoto total presente na biomassa foi determinado pelo método modificado de Kjeldahl (AOAC, 2006). Num tubo de Kjeldahl foram colocadas 0,2g de biomassa seca, 5mL de água destilada e 50mL de solução de digestão (134g K_2SO_4 + 650mL H_2O + 200mL H_2SO_4 + 2g HgO /25mL H_2SO_4 (6N)). A biomassa foi digerida num dispositivo de digestão (Buchi Digestion Unit K-424 - Figura 3.10) durante 4 horas. Posteriormente, foi colocada num dispositivo de destilação (Buchi Distillation Unit K-350 - Figura 2.10) por 6 minutos com os reagentes hidróxido de sódio e tiosulfato de sódio. Seguidamente, adicionou-se ao destilado 50mL de solução indicadora de ácido bórico. Por fim, fez-se uma titulação com solução *stock* de H_2SO_4 (0,02N), tendo a proteína total sido calculada multiplicando o azoto total pelo fator de conversão convencional de 6,25 (Jones, 1931).



Figura 2.10 – a) aparelho de digestão, b) aparelho de destilação, c) titulação

2.7.5 Conteúdo em Pigmentos

Num tubo de ensaio colocou-se 15mg de biomassa moída, 2mL de acetona e 0,7mg de microesferas de vidro. O tubo esteve 2 minutos num agitador de vortex e depois 5 minutos num banho de gelo. A amostra foi posteriormente centrifugada durante 8 minutos a 3900rpm (Sigma Sartorius 2-6E), tendo sido depois removida a parte líquida para outro tubo. O processo de agitação e banho de gelo foi repetido 4 vezes e novamente centrifugado e todo este procedimento foi repetido cerca de 6 vezes, até o líquido se apresentar sem cor. Toda a fase líquida foi quantificada e filtrada.

Os pigmentos totais foram calculados por espectrometria (Hitachi-2000), tendo a leitura sido feita entre os 380 e os 700nm.

Para a quantificação dos pigmentos totais usou-se a equação de Beer Lambert (Eq. 7) com um valor de 215L/(g.cm) para o coeficiente ótico específico e o comprimento de onda de máxima absorvância das amostras (Gouveia *et al.*, 1996)

$$\text{Equação 7} \quad \text{Pigmentos Totais (\%)} = \frac{A \times V \times f}{E_{1cm}^{1\%} \times m}$$

Onde A é a absorvância (ao comprimento de onda de máxima absorção), V é o volume total de pigmento extraído (mL), f é o fator de diluição, $E_{1cm}^{1\%}$ é o coeficiente de extinção e m o peso da amostra (g). O coeficiente de extinção utilizado baseou-se na média de $E_{1cm}^{1\%}$ dos carotenóides maioritariamente encontrados nas microalgas, segundo Gouveia & Empis (2003).

Os carotenóides foram identificados por cromatografia de camada fina (TLC), utilizando uma placa de sílica gel, que foi previamente aquecida na estufa a 80°C durante 30 minutos. O eluente consistiu numa mistura de éter de petróleo 40-60°C:acetona:dietilamina numa proporção 10:4:1 (v/v/v) (Figura 2.11).

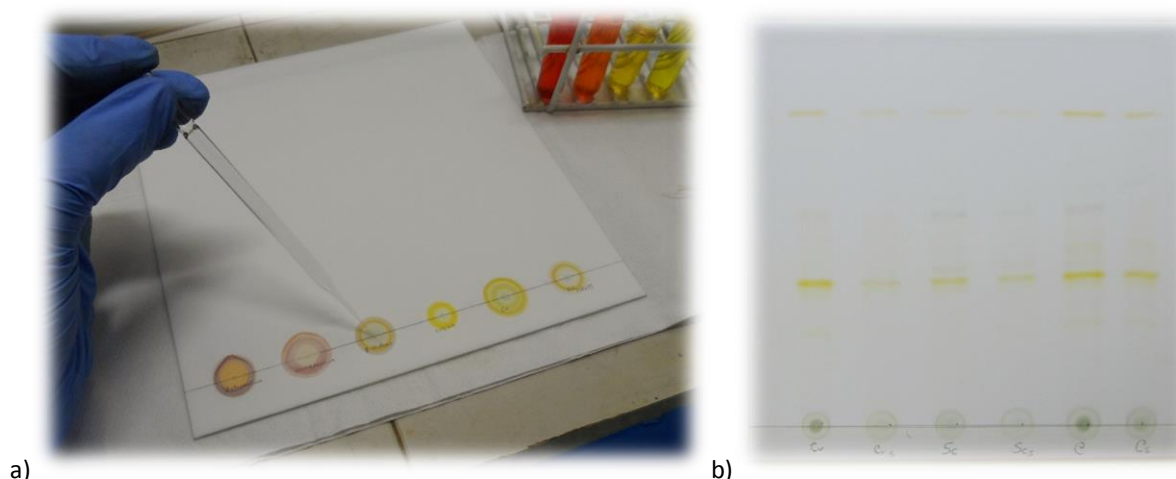


Figura 2.11 – a) preparação da placa de sílica gel, b) placa de sílica gel na fase final da eluição

Foram também preparados padrões dos pigmentos Astaxantina, β -caroteno, Cantaxantina e Luteína que foram igualmente colocados numa placa de sílica gel e eluídos com duas amostras de *C. vulgaris*.

2.8 Obtenção de biodiesel a partir de biomassa microalgal

2.8.1 Transesterificação direta ou *in situ*

Para o cálculo do rendimento da transesterificação direta utilizaram-se 100mg de cada uma das microalgas, em duplicado, tendo a biomassa sido moída previamente num moinho de bolas (Retsch - modelo MM400). A cada um dos frascos de 20mL, com a biomassa microalgal, adicionou-se o catalisador H_2SO_4 (1,2% v/v de metanol) e 4mL de metanol. Após selados e encapsulados, os frascos foram colocados numa incubadora durante 4 horas a uma temperatura de 55°C, com agitação a 200rpm. Posteriormente, adicionou-se 5mL de água destilada, para parar a reação, e 2mL de clorofórmio, agitando-se o frasco de modo a homogeneizar o seu conteúdo. Depois das fases bem separadas transferiu-se a fase inferior (fase orgânica) para um outro recipiente, fazendo-a passar por uma pipeta de Pasteur com algodão e sulfato de sódio anidro para remoção de humidade (Figura 2.12).

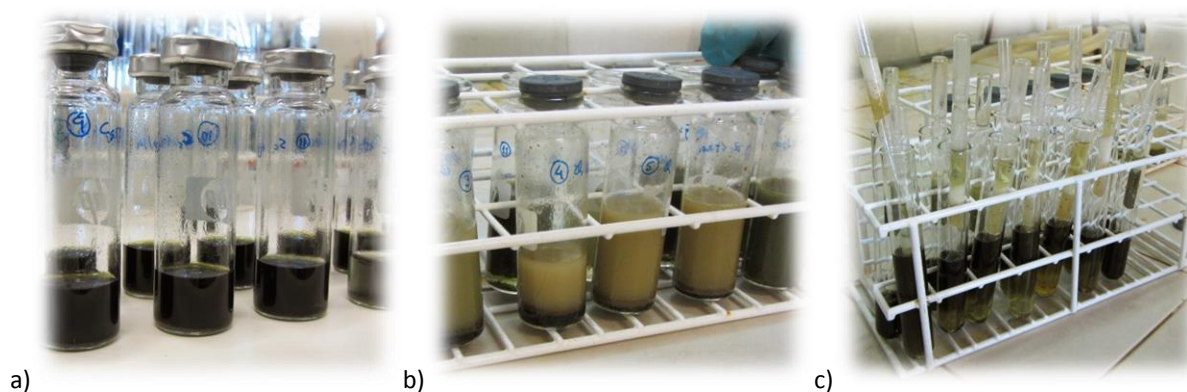


Figura 2.12 – Transesterificação direta: a) preparação das amostras, b) mistura com clorofórmio, c) filtração

Adicionou-se clorofórmio mais duas vezes e repetiu-se o processo. Evaporou-se o clorofórmio num banho termostatzado a 80°C e passou-se um jato de azoto para evaporar os vestígios de solvente. Adicionaram-se 1,5mL de solução padrão (heptadecanoato de metilo 10mg/mL, em heptano) a cada uma das amostras, as quais foram analisadas num cromatógrafo gasoso (Varian CP-3800 GC, USA), nas condições descritas no ponto 2.7.2.1. O cálculo do rendimento em Ésteres Metílicos foi realizado segundo a equação 8:

$$\text{Equação 8} \quad \% \text{ Ésteres Metílicos} = \frac{\frac{\varepsilon A - A_{P.I.}}{A_{P.I.}} \times m_{P.I.} \times \frac{V_{clor}}{V_A}}{m_{microalga}} \times 100$$

Onde εA é o somatório das áreas, $A_{P.I.}$ é a área do padrão interno, $m_{P.I.}$ é a massa do padrão interno, V_{clor} corresponde ao volume de clorofórmio adicionado, V_A é o volume de clorofórmio final e $m_{microalga}$ é a massa de microalga utilizada.

2.9 Produção de Biohidrogénio por fermentação no escuro

O biohidrogénio foi obtido por fermentação no escuro pela bactéria *Enterobacter aerogenes*, ATCC 13048 Sputum (American Type Culture Collection, Manassas, USA). O crescimento da bactéria foi feito em meio de cultura sintético composto por 20g/L de solução de peptona com 5g/L de NaCl, tendo sido posteriormente inoculada durante a sua fase exponencial. Para os ensaios de produção de hidrogénio foram utilizados frascos de vidro de 159mL com uma proporção de fase gasosa:fase líquida de 5:1. Foi utilizado como substrato biomassa algal (Cv, Sc e Cons. C) sujeita a stress, numa concentração de 2,5g_{massa seca}/L. O meio fermentativo continha K₂HPO₄ (7g/L), KH₂PO₄ (5,5g/L), triptona (5g/L), extrato de levedura (5g/L), (NH₄)₂SO₄ (1g/L), MgSO₄·7H₂O (0,25g/L), CaCl₂·2H₂O (0,021g/L), Na₂MoO₄·2H₂O (0,12g/L), ácido nicotínico (0,02g/L), Na₂SeO₃ (0,172mg/L) e NiCl₂ (0,02g/L). Os biorreatores contendo a biomassa algal e o meio fermentativo foram previamente esterilizados em autoclave a 121°C, por 15 minutos.

Durante a inoculação da cultura de bactérias nos reatores, com o meio fermentativo e o inóculo de microalgas, procedeu-se ao borbulhamento com N₂ de modo a eliminar o O₂ existente. A inoculação foi feita com a bactéria *E. aerogenes*, na sua fase exponencial, a 10% v/v e o reator foi selado com uma tampa de borracha e encapsulado com uma tampa de alumínio. O processo de fermentação foi conduzido numa incubadora orbital a 30°C, com agitação a 220rpm, tendo a cinética de produção de biohidrogénio sido seguida durante 8 horas (Batista *et al.*, 2014).

As amostras de gás foram retiradas diretamente da fase gasosa dos reatores e o seu conteúdo em H_2 e CO_2 foi analisado por cromatografia gasosa, num Varian 430-GC com um detetor de condutividade térmica e coluna de sílica fundida (select Permanent gases/ CO_2 -Molsieve 5A/Borabound Q tandem #CP 7430). O injetor de gases e a coluna encontravam-se a $80^\circ C$ e o detetor a $120^\circ C$. O gás de arraste utilizado foi o árgon, a uma taxa de $32,4 mL/min$, e usou-se uma seringa de gás para a injeção de $0,5 mL$ de gás da fase gasosa de cada reator, no cromatógrafo.

O sobrenadante dos ensaios de fermentação, obtidos por centrifugação a $15000 rpm/2 min$ (Hitachi Himac CT15E) e filtração, foram analisados num HPLC em termos de concentração de etanol e ácidos orgânicos.

Esta análise foi conduzida num sistema Merck Hitachi HPLC (Darmstadt, Germany) equipado com uma coluna Aminex HPX-87H e com um detetor de índice de refração. A temperatura da coluna foi ajustada a $50^\circ C$ e o eluente consistiu em H_2SO_4 , $5 mM$ a uma taxa de $0,5 mL/min$. O volume da injeção foi de $20 \mu L$.

3. Resultados e Discussão

3.1 Produtividade das microalgas e eficiência de remoção dos nutrientes

As águas residuais, utilizadas na alimentação das microalgas no fotobiorreator, apresentavam composições distintas devido, entre outros fatores, à variação sazonal da população e à pluviosidade (Tabela 3.1). A Tabela 3.2 mostra a produtividade máxima das três microalgas, as taxas máximas de remoção e o tempo até serem atingidas essas taxas (Graça *et al.*, 2014).

Tabela 3.1 – Caracterização dos efluentes residuais de Águas da Figueira (AdF) usadas nos ensaios

	Caraterização das Alimentações (mg/L)						
	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	N-NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	P-PO ₄ ³⁻	P ₂ O ₅	CQO
Efluente de julho (<i>Chlorella vulgaris</i>)	156,12	< 2,2	< 0,5	12,6	4,0	9,4	145
Efluente de outubro (<i>Scenedesmus obliquus</i>)	222,2	< 2,2	< 0,5	14,3	4,8	10,8	131
Efluente de novembro (Consórcio C)	473,0	< 2,2	< 0,5	22,8	7,5	17,0	147
Efluente de março (<i>Chlorella vulgaris</i>)	37,0	< 2,2	< 0,5	4,8	1,5	3,8	78
Efluente de junho (<i>Scenedesmus obliquus</i>)	20,9	5,5	1,3	21,0	6,8	15,8	68

O CQO presente nas águas residuais, antes do tratamento com microalgas, já se encontrava abaixo dos limites máximos de emissão (Tabela 3.1), pelo que não constituiria uma limitação. Porém, do ponto de vista ambiental, é sempre melhor ter valores menores.

O primeiro ensaio com *Chlorella vulgaris* decorreu entre julho e agosto de 2013 e durou 12 dias, não tendo sido feita qualquer alimentação. A produtividade máxima foi atingida ao 5º dia, sendo 0,10g.L⁻¹.dia⁻¹ e as remoções máximas de azoto total, fósforo e CQO foram, respetivamente, 84%, 95% e 36%. No entanto, teria de ser atingida uma remoção > 87% de azoto total para que os requisitos de emissão das águas residuais fossem cumpridos. O fósforo contido no efluente estava abaixo dos limites.

O primeiro ensaio com *Scenedesmus obliquus* decorreu em outubro de 2013 e durou 13 dias, tendo sido feita uma alimentação no 8º dia da experiência. A produtividade máxima para o *S. obliquus* foi atingida no 9º dia, sendo 0,44g.L⁻¹.dia⁻¹ e as remoções máximas de azoto total, fósforo e CQO foram 95%, 92% e 63%, respetivamente. Os critérios de emissão para o azoto foram atingidos ao fim dos 12 dias, o fósforo estava dentro dos limites.

O ensaio com o Consórcio C decorreu entre novembro e março e durou 103 dias, tendo sido feitas sete alimentações depois da primeira inoculação. A produtividade máxima para o Consórcio C foi alcançada ao 72º dia, sendo 0,90g.L⁻¹.dia⁻¹ e as remoções máximas de azoto total, fósforo e CQO foram 98%, 100% e 64%, respetivamente. Os critérios de emissão para o azoto foram atingidos ao fim de 33 dias e para o fósforo ao 26º dia.

O 2º ensaio com *C. vulgaris* decorreu entre abril e maio de 2014, durou 43 dias e foram feitas 3 alimentações. A produtividade máxima neste ensaio foi obtida no 1º dia, sendo 0,38g.L⁻¹.dia⁻¹ e as

remoções máximas de azoto total, fósforo e CQO foram 76%, 56% e 40%, respetivamente. É importante considerar que este efluente possuía muito menor carga do que os anteriores para os três parâmetros, ainda assim, a cultura levou 19 dias para consumir o azoto em excesso.

O 2º ensaio com *S. obliquus* decorreu entre junho e julho de 2014, durou 28 dias e foram feitas 3 alimentações. A produtividade máxima neste caso verificou-se ao 13º dia, sendo 0,98g.L⁻¹.dia⁻¹ e as remoções máximas de azoto total, fósforo e CQO foram 80%, 93% e 38%, respetivamente. Este efluente também apresentava uma carga relativamente baixa para os três parâmetros, tendo a cultura ao fim de 5 dias consumido o azoto e fósforo necessários ao cumprimento dos requisitos.

Tabela 3.2 – Taxas máximas de remoção de nutrientes e respetivas produtividades máximas, para cada alimentação, para as diferentes microalgas

Ensaio	Taxas máximas de remoção para cada alimentação (%)						Produtividade máxima de biomassa (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	Concentração máxima de biomassa (g.L ⁻¹)
	N _{total}	Dia	P-PO ₄ ³⁻	Dia	CQO	Dia		
<i>Chlorella vulgaris</i> Efluente de julho	84	11	95	8	36	4	0,10	0,44
<i>Scenedesmus obliquus</i> Efluente de outubro	80	8	86	8	63	5	0,35	0,90
	95	13	92	13	39	13	0,44	1,31
Consórcio C Efluente de novembro	98	36	99	36	64	12	0,51	1,13
	90	43	17	43	0	43	0,12	0,87
	88	56	99	56	43	54	0,21	1,79
	31	62	0	62	0	62	0,10	0,54
	92	69	98	69	32	69	0,90	0,50
	94	83	100	83	20	83	0,15	0,90
	95	93	99	90	0	90	0,27	0,65
	91	103	96	99	0	99	0,06	0,59
<i>Chlorella vulgaris</i> Efluente de março	68	21	45	21	40	9	0,38	0,86
	76	26	23	26	0	26	0,04	0,35
	57	34	20	34	0	34	0,00	0,08
	70	43	56	40	29	43	0,02	0,28
<i>Scenedesmus obliquus</i> Efluente de junho	80	9	93	9	38	5	0,56	1,11
	74	12	58	16	0	12	0,98	1,79
	80	19	59	19	0	19	0,31	0,67
	73	26	52	23	19	26	0,28	0,94

De acordo com o anteriormente exposto, as taxas de remoção para o azoto e fósforo permitiram a descarga das águas residuais, provando que este fotobiorreator é suficientemente eficiente no tratamento destas mesmas águas.

O tratamento das águas residuais conduzido pelas microalgas Cv e Sc está próximo dos encontrados na literatura. Foram descritas remoções de N e P próximas de 100% com *C. vulgaris*, no tratamento de águas residuais urbanas (Ji *et al.*, 2013). Também Arbib e colaboradores (2014) atingiram remoções superiores a 90% para o azoto e a 98% para o fósforo para a *C. vulgaris* e *S. obliquus* (Arbib *et al.*, 2014). Os mesmos autores obtiveram produtividades muito próximas das obtidas no presente estudo para a *C. vulgaris* (0,113g.L⁻¹.dia⁻¹) e significativamente inferiores para *S. obliquus* (0,152g.L⁻¹.dia⁻¹), tal como McGinn *et al.* (2012) que alcançaram produtividades máximas de 0,267g.L⁻¹.dia⁻¹ para *S. obliquus* em águas residuais e cultura contínua. Estes últimos autores obtiveram remoções de azoto total e fósforo de 90% em 6,5 dias, no entanto partiram de um efluente secundário que continha cerca de menos 80% de carga dos nutrientes N e P. Esta pode ser uma das razões que explica a produtividade consideravelmente superior da microalga Sc no presente ensaio.

Na 2ª experiência com *Sc* atingiram-se as taxas de produtividade mais elevadas, $0,98\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, o que era expectável, dado as condições meteorológicas mais favoráveis, uma vez que era junho. O ensaio com o *Cons. C* alcançou taxas de produtividade bastante próximas da anterior ($0,90\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) e as mais elevadas de remoção de nutrientes, o que seria expectável, uma vez que o consórcio foi isolado do efluente e estaria melhor adaptado às águas residuais do que os restantes (Graça *et al.*, 2014). Porém, esses resultados foram alcançados ao fim de um período de tempo mais longo. É, por isso, importante referir que as condições nas quais o *Cons. C* se desenvolveu (nomeadamente temperatura média do ar e insolação) eram muito menos favoráveis do que para aquelas em que se desenvolveram as outras duas espécies.

As taxas de produtividade alcançadas pela *Sc* são, também, consideravelmente mais elevadas do que as obtidas por Ho e colaboradores (2013) de $0,55\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e por El-Sheekh e colaboradores (2013) de $0,29\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, ambas produzidas em meios de cultura sintéticos (El-Sheekh *et al.*, 2013; Ho *et al.*, 2013). Similarmente Gouveia & Oliveira (2009) alcançaram produtividades de $0,18\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e $0,21\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ para *C. vulgaris* e *S. obliquus*, respetivamente, produzidas em meios de cultura sintéticos, o que também é consideravelmente inferior ao alcançado no presente estudo. Do ponto de vista económico e ambiental este resultado é altamente promissor.

3.2 Colheita de microalgas: eletrocoagulação versus centrifugação

No processo de eletrocoagulação com vista à colheita da biomassa microalgal, o efeito da corrente elétrica no meio de cultura origina um distúrbio na camada elétrica negativa existente à superfície das células e a formação de microbolhas de O_2 e/ou H_2 , que conduzem à formação de flóculos de microalgas. Durante o processo, os elétrodos libertam iões metálicos que funcionam como agentes floculantes. Os flóculos formados normalmente deslocam-se para a superfície da suspensão (flotação) e caem posteriormente (sedimentação). Durante o processo de EC foi visível a suspensão tornar-se cada vez mais transparente e a superfície do meio ficar com uma camada de flóculos de microalgas cada vez mais densa (Figura 3.1).

A eficiência do processo de EC é superior em espécies de microalgas marinhas, uma vez que a existência de cloreto de sódio no meio aumenta a condutividade do mesmo, levando a menores consumos de energia elétrica. Por esta razão é possível obter melhores resultados com a EC em culturas salinas, como a *Nannochloropsis* sp., (Matos *et al.*, 2013) ou *Tetraselmis* sp. (Uduman *et al.* 2011) do que em culturas de água doce, como a *S. obliquus*.



Figura 3.1 - Controlo e após o processo de EC a 0,2A durante 6 minutos, em *S. obliquus*

No presente estudo o efeito da aplicação de corrente elétrica ao meio de cultura com microalgas foi testado utilizando diferentes intensidades de corrente, tempos de operação e tamanhos de elétrodos de alumínio.

Os resultados (Figura 3.2) mostram que é possível atingir eficiências de recuperação de biomassa da *S. obliquus* superiores a 95% em apenas 6 minutos, aplicando 10mA.cm^{-2} . A recuperação máxima alcançada foi de 99% para intensidades de corrente elétrica de 11mA.cm^{-2} . O aumento da intensidade de corrente de 0,2 para 0,4A não aumentou significativamente a eficiência do processo na recuperação da biomassa para o tempo final testado.

A aplicação de corrente elétrica durante 2 minutos para qualquer das intensidades de corrente e área de elétrodos resultou em recuperações da biomassa inferiores a 70%, exceto para a situação de maior área de elétrodos e amperagem mais elevada.

A utilização de 0,3A, com voltagem média de 12,8V, atingiu recuperações de biomassa de 99% para os elétrodos com uma área de 20cm². Para os elétrodos com 36cm² a recuperação foi de 88%, sendo a voltagem média de 10,8V. Esta diferença deve-se ao facto de estar a ser aplicada uma intensidade de corrente de 15mA.cm⁻² na primeira situação e de 8,3mA.cm⁻² na segunda situação (36cm² de elétrodos).

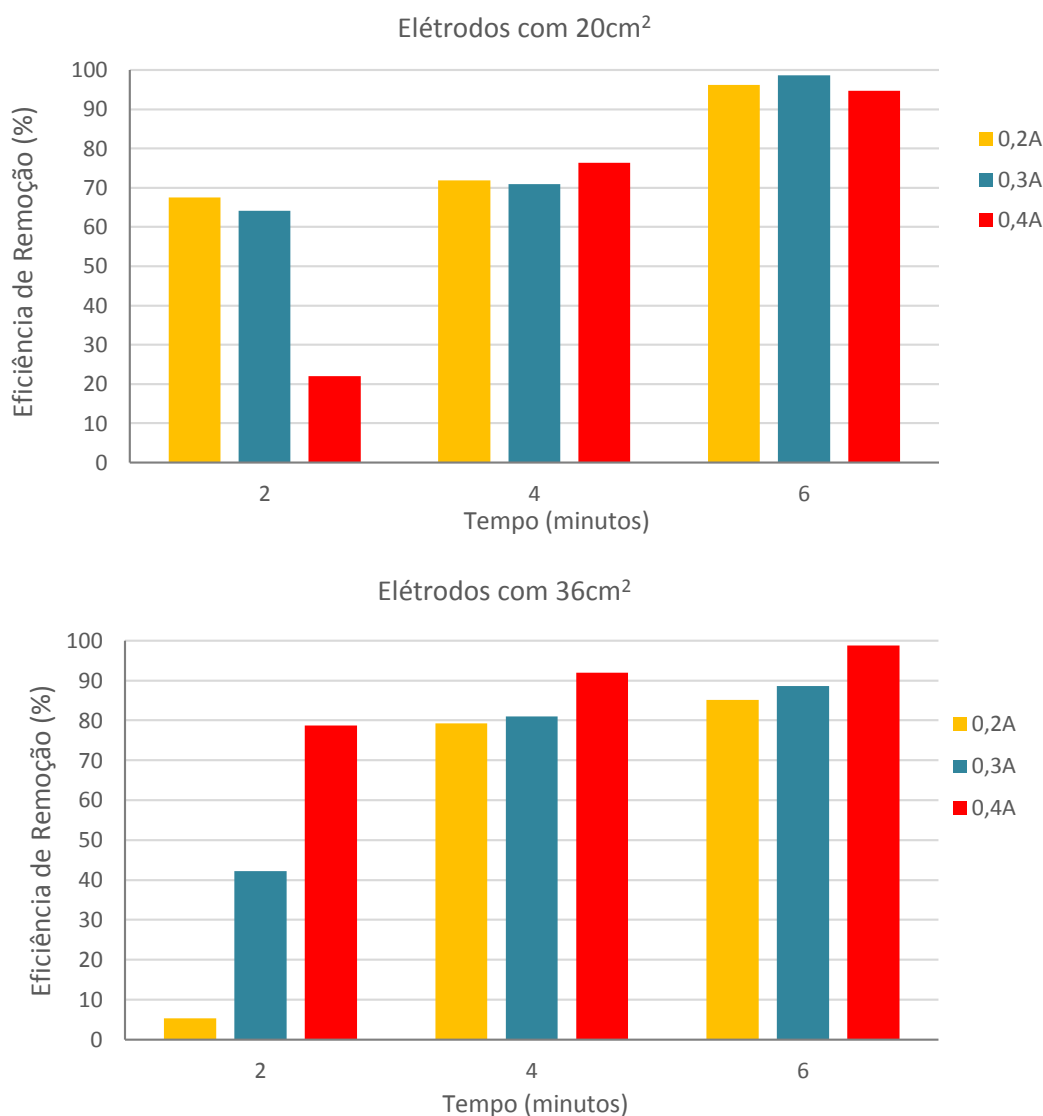


Figura 3.2 – Eficiências de remoção de biomassa para diferentes amperagens e áreas de elétrodos, para a microalga *S. obliquus*

Estes resultados estão em concordância com outros descritos para a recuperação de *Botryococcus braunii*, também uma microalga de água doce, onde 30 minutos foram suficientes para recuperar 90% da biomassa. Neste caso a intensidade de corrente aplicada foi de 1,3mA.cm⁻² (Xu *et al.*, 2010). Segundo outros estudos, as eficiências de recuperação de biomassa com a EC podem ser de 80 a 95%, podendo mesmo atingir os 100% em condições otimizadas (Uduman *et al.*, 2011).

A relação entre a área dos elétrodos e o volume de cultura é um parâmetro importante na determinação da solução mais económica e eficiente do ponto de vista energético. Por outro lado, a intensidade de corrente a aplicar é um parâmetro que tem de ser otimizado em função da concentração do meio de cultura.

A diminuição do volume total de cultura a centrifugar, utilizando o processo de eletrocoagulação, é muito significativo. Neste ensaio, partindo de um volume inicial de 5 litros de biomassa verde de *Sc*, foram centrifugados apenas 0,24L. O consumo associado a esta centrifugação foi de 0,07kWh.

A centrifugação do volume total de meio (5L) teria um consumo de 1,38kWh, por comparação com o que foi gasto na totalidade do processo de EC, no valor de 0,08kWh (eletrocoagulação com agitação + centrifugação). Assim, a utilização do processo de eletrocoagulação antes da centrifugação resultou numa diminuição de 94,2% de energia.

A Figura 3.3 explicita a variação do consumo elétrico, por metro cúbico de cultura, em função do processo utilizado para a colheita das microalgas.

Os resultados do presente estudo são similares aos obtidos com *Nannochloropsis* sp., (microalga de água salgada) com uma diminuição da energia consumida de 92% (Matos *et al.*, 2013). Num ensaio com *Spirogyra* sp. foram obtidas diminuições do consumo energético com a colheita, de cerca de 90% (Ferreira *et al.*, 2014).

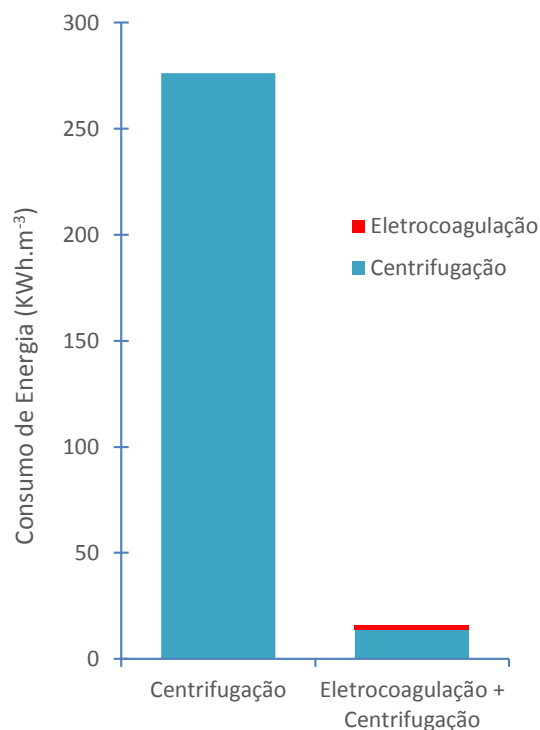


Figura 3.3 – Estimativa do consumo energético para diferentes cenários de colheita de microalgas, num metro cúbico de cultura

3.3 Secagem de microalgas: estufa, liofilizador e secador solar

A biomassa algal utilizada neste trabalho foi maioritariamente seca em estufa. No entanto, para se obter biomassa seca utilizando a estufa a 70°C foi necessário um tempo de operação de cerca de 6 a 8 horas (humidade da biomassa próxima de 85%), o que se traduziu num consumo de cerca de 0,434kWh. A estufa utilizada tinha capacidade para secar de 1,2kg de biomassa, obtendo-se no final quase 0,2kg de biomassa seca, ou seja, o consumo foi cerca de 0,361kWh.kg⁻¹ biomassa húmida.

A utilização do liofilizador implica que a biomassa seja congelada antes. O processo de secagem requer normalmente cerca de 24h, dependendo da quantidade de biomassa a liofilizar, o que resulta num consumo aproximado de 8,73kWh. Utilizando toda a capacidade do liofilizador, resultaria num gasto de cerca de 1,46kWh.kg⁻¹ biomassa húmida. Este processo de secagem origina uma biomassa em pó, bastante homogénea, sem perda de qualidade e facilmente utilizável para outros processos.

No caso da secagem em estufa, a biomassa fica em placas e grumos, sendo difícil soltá-la dos recipientes onde foi colocada; para homogeneizar a biomassa é necessário, a maior parte das vezes, passar por um moinho de café antes da biomassa ser utilizada.

O secador solar (Figura 3.4) permitiu secar a biomassa algal com 85% de humidade em cerca de 4 a 5 horas. A temperatura média do ar no exterior durante o período de secagem foi de 28°C e a humidade relativa de 15%, o céu apresentou-se praticamente sem nuvens durante a totalidade do ensaio. O interior do secador solar atingiu uma temperatura máxima de 63°C e uma humidade relativa de 4% o que possibilitou a rápida secagem da biomassa. As principais vantagens do secador solar foram não apresentar qualquer consumo de energia elétrica e um reduzido tempo de secagem.

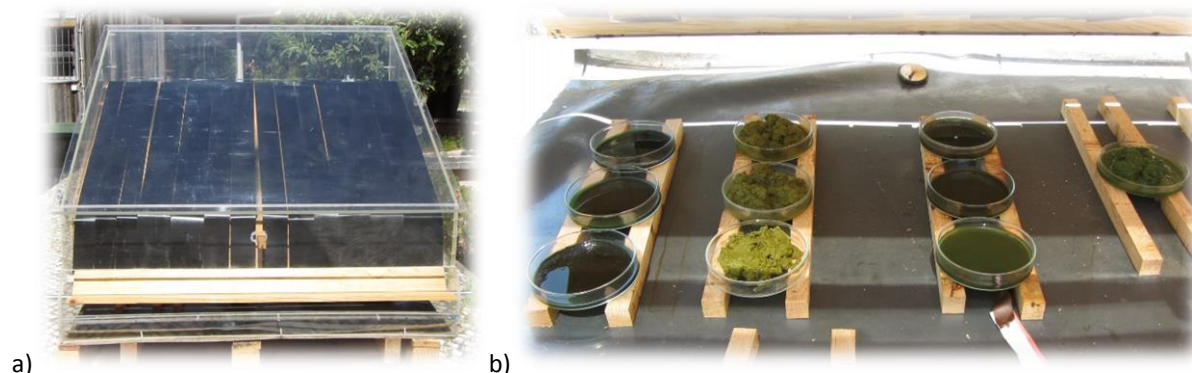


Figura 3.4 – Secador Solar SECMAAD, LNEG: a) exterior, b) interior com a biomassa a secar

A Figura 3.5 mostra a evolução da temperatura e humidade relativa no interior e exterior do secador solar, durante os ensaios de secagem da biomassa algal.

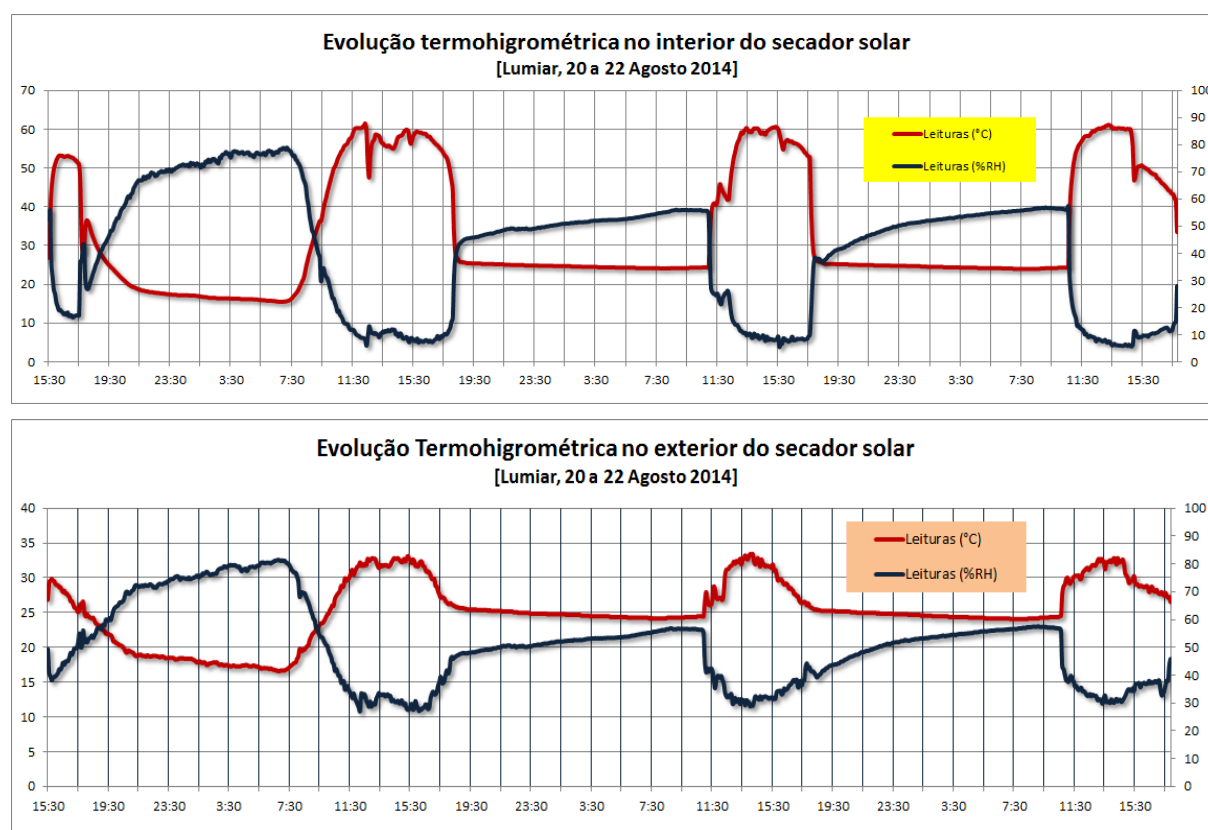


Figura 3.5 – Temperatura e humidade no interior e exterior do secador solar, durante o período de ensaios de secagem da biomassa no secador solar

Ferreira e colaboradores (2014) utilizaram o mesmo protótipo de secador solar (SECMAD, LNEG) para secar biomassa de *Spirogyra*, conseguindo passar de uma humidade de 85% para 5% em apenas 3 a 4 horas. Todavia, a experiência foi conduzida utilizando uma pequena ventoinha de 20W para forçar a circulação de ar o que poderá ter facilitado a secagem e reduzido o tempo de operação (Ferreira *et al.*, 2014).

3.4 Caraterização da biomassa algal

Os resultados obtidos para a caraterização bioquímica das três microalgas (*C. vulgaris*, *S. obliquus* e Consórcio C) e para os dois estados de desenvolvimento em que foram estudadas (normal e *stressada*) encontram-se compilados na Tabela 3.3 e estão expressos em percentagem de peso seco.

Tabela 3.3 – Composição da biomassa algal (Cv: *C. vulgaris*; Sc: *S. obliquus*; Cons. C: Consórcio C). Valores médios \pm desvio padrão, expressos em percentagem de peso seco (% ps).

	Cv	Cv stress	Sc	Sc stress	Cons. C	Cons. C stress
Lípidos (% ps)	7,85 \pm 0,89	11,42 \pm 0,63	6,56 \pm 0,46	24,05 \pm 1,53	6,38 \pm 4,07	11,96 \pm 0,87
Açúcares Totais (% ps)	23,94 \pm 0,89	19,52 \pm 1,31	13,49 \pm 4,67	40,58 \pm 8,10	19,00 \pm 4,16	26,77 \pm 0,99
Proteína Bruta (% ps)	51,57 \pm 5,84	30,33 \pm 0,72	26,53 \pm 1,04	34,06 \pm 0,20	47,40 \pm 3,80	42,35 \pm 1,15
Pigmentos (% ps)	0,96 \pm 0,01	0,30 \pm 0,01	0,54 \pm 0,00	0,95 \pm 0,12	0,72 \pm 0,20	0,62 \pm 0,03
Cinzas (% ps)	17,86 \pm 0,36	11,35 \pm 0,50	14,95 \pm 0,47	5,47 \pm 1,14	7,70 \pm 1,60	6,50 \pm 0,32

3.4.1 Conteúdo em Cinzas

O conteúdo de cinzas da Cv é sempre mais elevado do que o das restantes microalgas, quer enquanto biomassa verde, quer como biomassa stressada. No caso da Sc existe uma variação considerável do conteúdo de cinzas, entre os dois estados de desenvolvimento, com o estado stressado a apresentar um valor bastante baixo. No caso do Cons. C a quantidade de cinzas é baixa nas duas situações.

3.4.2 Conteúdo em Lípidos

O conteúdo em lípidos para as microalgas Cv, Sc e Cons. C (não *stressadas*), moídas em moinho de bolas, é baixo, cerca de 8%, 7% e 6%, respetivamente. No entanto, para as três microalgas verifica-se um aumento do teor em lípidos depois de sujeitas a *stress*, sendo essa variação mais significativa no caso da Sc, apresentando a Sc *stress* um teor em lípidos de cerca de 24%. A Figura 3.6 apresenta o conteúdo em lípidos das três algas para os dois estados de desenvolvimento.

Na literatura são apresentados valores de conteúdo lipídico, para *C. vulgaris*, até 13-30% em águas residuais, em função das características específicas de cultivo (Arbib *et al.*, 2014; He *et al.*, 2013; Ji *et al.*, 2013). Contudo, Gouveia & Oliveira (2009) obtiveram um conteúdo lipídico de 5,1% para esta espécie, quando sujeita a deficiência de azoto. Para *S. obliquus* os estudos mencionam usualmente conteúdos lipídicos na ordem dos 17 a 29% (Arbib *et al.*, 2014; Batista *et al.*, 2014; Ji *et al.*, 2013).

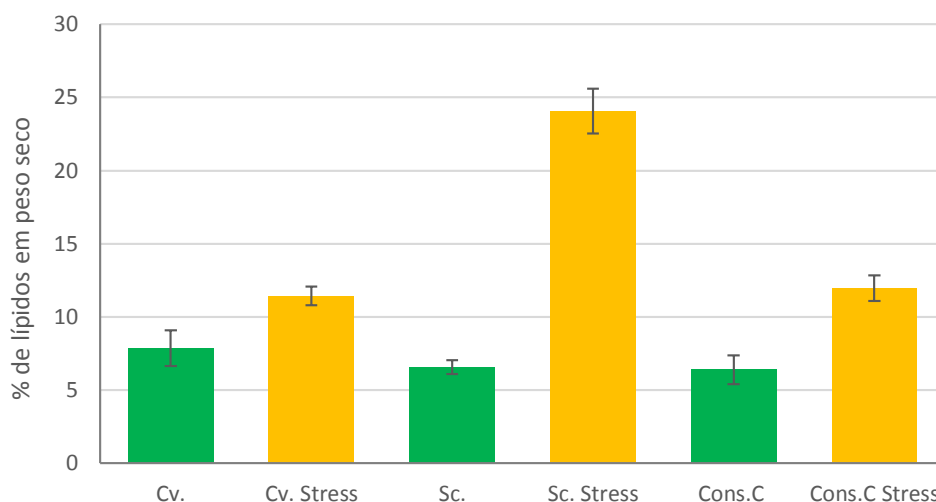


Figura 3.6 – Conteúdo lipídico das microalgas em estudo, expresso em % ps (Cv: *C. vulgaris*; Sc: *S. obliquus*; Cons. C: Consórcio C)

Tem sido referenciado por diversos autores que as microalgas produzem mais lípidos quando sujeitas a *stress* ou a ambientes desfavoráveis, por comparação com as condições ótimas de crescimento (Gouveia & Oliveira, 2009; Zhekisheva *et al.*, 2002). Em condições ótimas as microalgas sintetizam ácidos gordos sobretudo para esterificarem em glicerol (lípidos principais da membrana que constitui entre 5 a 20% do peso seco da célula). Em condições desfavoráveis muitas microalgas alteram o seu caminho da biossíntese de lípidos (que incluem ácidos gordos de C10 a mais de C20) para a formação e acumulação de lípidos neutros (20 a 50% ps), principalmente na forma de triacilglicerol (TAG). Estas substâncias servem especialmente como reserva de carbono e energia e depois de sintetizadas são depositadas em densos corpos lipídicos localizados no citoplasma da célula (Kirrolia *et al.*, 2013).

O aumento observado no conteúdo lipídico das várias microalgas (Cv, Sc e Cons. C), quando sujeitas a *stress*, corrobora a explicação apresentada acima.

Os teores em lípidos obtidos por extração com hexano a partir da biomassa seca moída em moinho de bolas (Tabela 3.3) foram comparados com os obtidos após hidrólise ácida da biomassa, de modo a determinar a eficiência do processo de ruptura celular no moinho de bolas. Os resultados (Tabela 3.4) mostram que o processo de hidrólise ácida é mais eficiente na ruptura celular, permitindo a contabilização de um maior teor de lípidos. Esta situação sugere a necessidade de otimização do processo de ruptura celular no moinho de bolas, eventualmente aumentando o tempo de moagem para as microalgas em estudo.

Tabela 3.4 – Percentagem de lípidos detetados na biomassa em função do pré-tratamento

	Lípidos (% ps)	
	Moinho de Bolas + Soxhlet	Hidrólise Ácida + Soxhlet
Cv	7,85	8,28
Cv stress	11,42	13,57
Sc	6,56	n.d.
Sc stress	24,05	n.d.
Cons. C	6,38	9,55
Cons. C stress	11,96	13,86

n.d. - Não foi possível fazer a determinação por falta de amostra

3.4.3 Conteúdo em Açúcares

As microalgas estudadas apresentaram valores de hidratos de carbono entre 13 e 24% para a situação de biomassa *normal* e entre 20 e 41% para a biomassa sujeita a *stress*. No entanto, o conteúdo mais elevado de açúcares verificou-se para *Sc stress*, 41% e o mais baixo para *Sc*, 13%. A Figura 3.7 apresenta o conteúdo em açúcares das três biomassas *normal* e *stressada*.

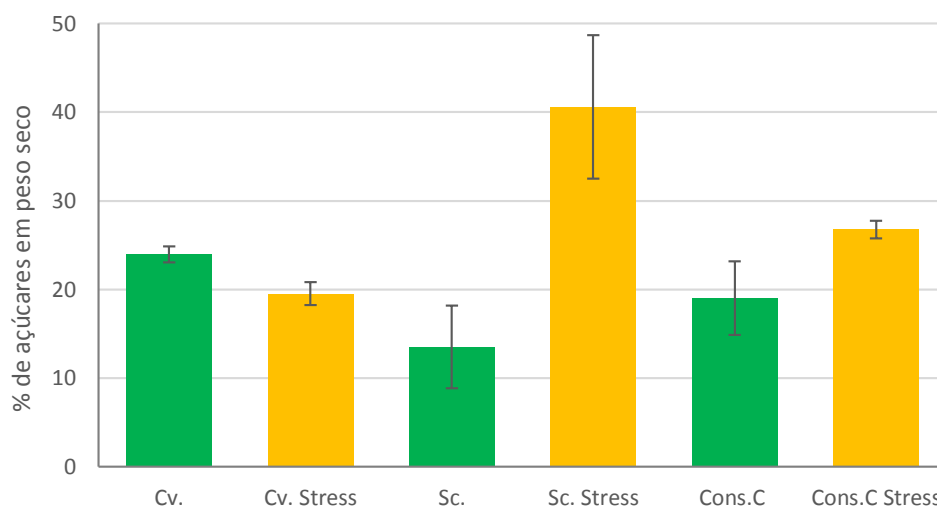


Figura 3.7 – Conteúdo em hidratos de carbono das microalgas em estudo, expresso em % ps (Cv: *C. vulgaris*; Sc: *S. obliquus*; Cons. C: Consórcio C)

Os valores obtidos encontram-se dentro da gama dos obtidos por alguns autores para *C. vulgaris* verde e carotenogénica, respetivamente 20 e 23% (Batista *et al.*, 2013), mas superiores aos de outros autores (He *et al.*, 2013), cerca de 14%, para meio com pouco azoto. Relativamente a *S. obliquus* os valores alcançados são inferiores aos de Miranda *et al.* (2012) e de Batista *et al.* (2014), respetivamente 32 e 31%, ambos produzidos em meio de cultura Bristol. Contudo, para *Sc stress* o conteúdo em açúcar foi bastante elevado, apesar de inferior ao alcançado por Ho *et al.* (2012) (52%) em situação de deficiência de azoto. Este conteúdo elevado em hidratos de carbono representa um aspeto muito positivo que possibilita a utilização destas biomassas, cultivadas a partir de águas residuais, como substrato na produção de biohidrogénio e bioetanol.

A utilização da *S. obliquus* já foi referenciada por diversos autores como tendo grande potencial para a produção destes dois combustíveis, para além de biodiesel (Batista *et al.*, 2014; Miranda *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2012; Papazi *et al.*, 2012; Choi *et al.* 2011).

Tal como verificado para *Sc*, também no caso do *Cons. C*, a indução de *stress* na cultura resultou num aumento do teor de açúcares nas células.

3.4.4 Conteúdo em Proteínas

O conteúdo em proteínas para as microalgas estudadas, em ambas as situações nutricionais, é elevado. O valor mais alto foi verificado para *Cv*, 52%, enquanto o valor menor correspondeu à *Sc*, com 27% de proteína em peso seco (Figura 3.8).

Os valores encontrados para *Cv* são muito superiores aos obtidos por alguns autores (Arbib *et al.*, 2014; He *et al.*, 2013), respetivamente 22% e 42%. Foram também relatados por Batista *et al.* (2013) valores de 38% e 12% para biomassa de *C. vulgaris* verde e carotenogénica, respetivamente. Em ambas as situações estes valores são consideravelmente inferiores aos encontrados no presente estudo. No caso de *Sc* e *Sc stress* os valores alcançados foram, respetivamente, 27 e 34%. Outros

autores obtiveram valores de 20%, 16% e 12%, todos produzidos em meios sintéticos, sem deficiências em azoto (Batista *et al.*, 2014; Arbib *et al.*, 2014; Martinez *et al.*, 2000). Valores de 33% e 8% de proteína, respetivamente para antes e após indução de *stress* em meio de cultura laboratorial foram relatados (Wang *et al.*, 2013).

Os valores obtidos são, assim, maioritariamente superiores aos obtidos nos restantes estudos em meios sintéticos, denotando novamente uma enorme vantagem económica e ecológica da produção de microalgas em águas residuais.

A Figura 3.8 apresenta a comparação do conteúdo em proteínas das três biomassas, *normal* e *stressada*. Como era expectável, a indução de *stress* nutricional nas culturas estudadas resultou numa diminuição da quantidade de proteína, associada a um aumento de teor de lípidos e açúcares, uma vez que a síntese de proteínas está diretamente relacionada com a presença de azoto (Martinez *et al.*, 2000). Esta situação não foi verificada para a *Sc*, podendo esse facto dever-se à possibilidade da parede celular da *Sc* não ter sido quebrada convenientemente, devido à sua grande robustez (Voigt *et al.*, 2014).

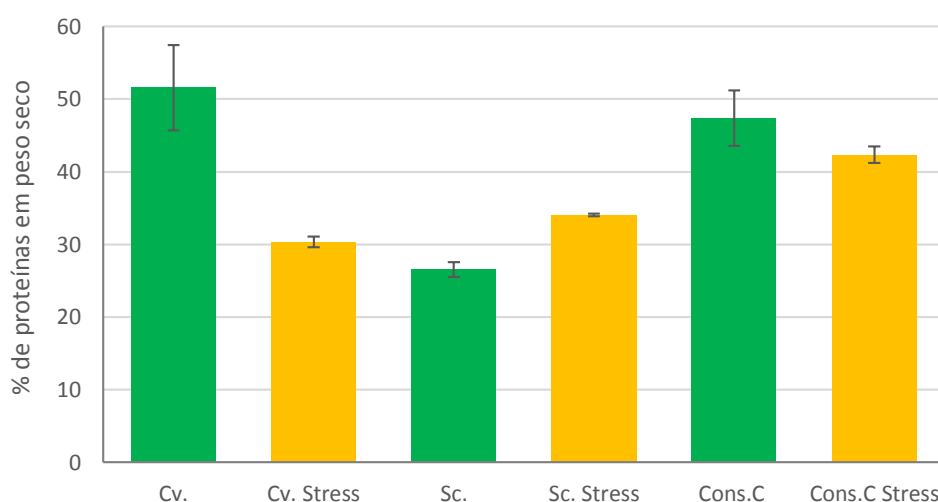


Figura 3.8 – Conteúdo em proteínas das microalgas em estudo, expresso em % ps (Cv: *C. vulgaris*; Sc: *S. obliquus*; Cons.C: Consórcio C)

3.4.5 Conteúdo em Pigmentos

Os pigmentos totais obtidos para cada uma das biomassas estudadas encontram-se na Tabela 4.3 e variam entre 0,30 e 0,96% em peso seco. A Figura 3.9 mostra a variação dos pigmentos totais para as várias microalgas.

Os valores mais elevados correspondem a *Cv* e *Sc stress*, 0,96% e 0,95%, respetivamente, enquanto o mais baixo é da biomassa de *Cv stress*. Estes valores são semelhantes aos obtidos por alguns autores onde *C. vulgaris* não sujeita a *stress* apresentava 1,2% de pigmentos totais, diferem porém quando a microalga foi sujeita a *stress*, pois o seu conteúdo em pigmentos aumentou para 1,3% (Batista *et al.*, 2013). Também foram detetados conteúdos de pigmentos na *S. obliquus* bastante inferiores, 0,13% (Hodaifa *et al.*, 2010) e 0,7% (Ten *et al.*, 2013) ambos produzidos sem indução de *stress*. O *Conc. C* não apresentou grande variação entre as duas condições de cultura, apresentando aquilo que é considerado um conteúdo médio em pigmentos (Milledge, 2011).

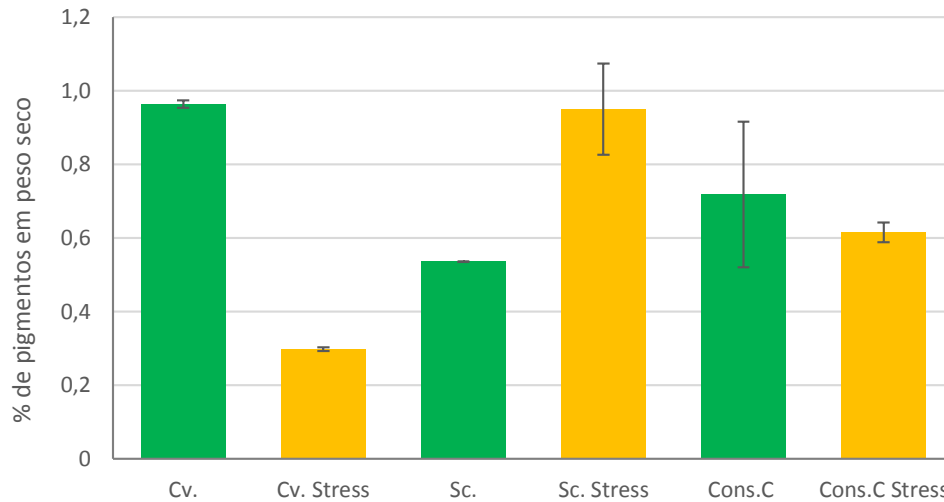


Figura 3.9 – Conteúdo em pigmentos totais das microalgas em estudo, expresso em % ps (Cv: *C. vulgaris*; Sc: *S. obliquus*; Cons. C: Consórcio C)

Os perfis obtidos no espectrofotômetro para cada uma das três microalgas denotam uma grande semelhança entre o perfil de *C. vulgaris* e o do Consórcio C, podendo indicar a presença maioritária de *C. vulgaris* no consórcio e/ou a presença maioritariamente de clorófitas (Figura 3.10, 3.11, 3.12). Estes perfis correspondem ao estado não *stressado*.

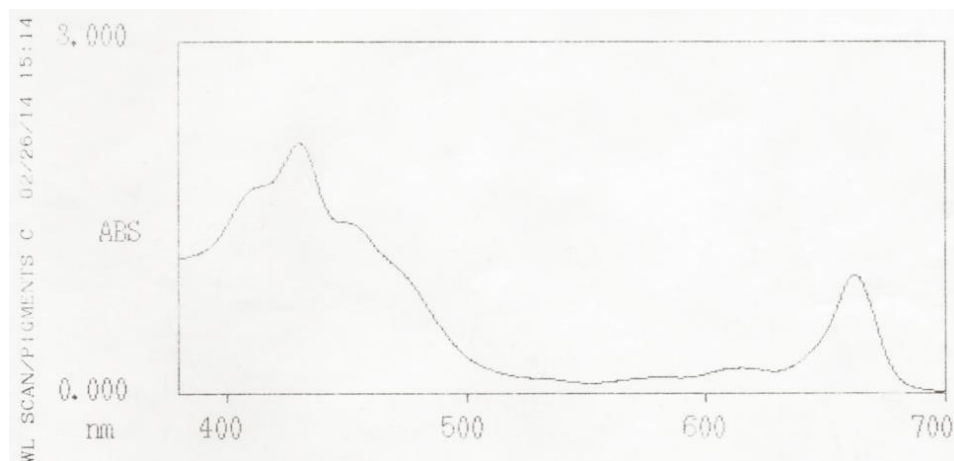


Figura 3.10 – Perfil de pigmentos totais na *Chlorella vulgaris* obtido no espectrofotômetro

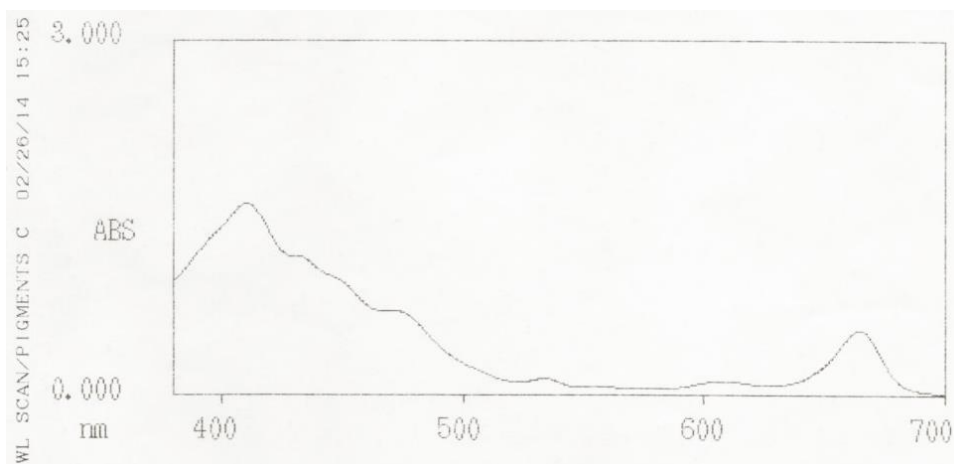


Figura 3.11 – Perfil de pigmentos totais na *Scenedesmus obliquus* obtido no espectrofotômetro

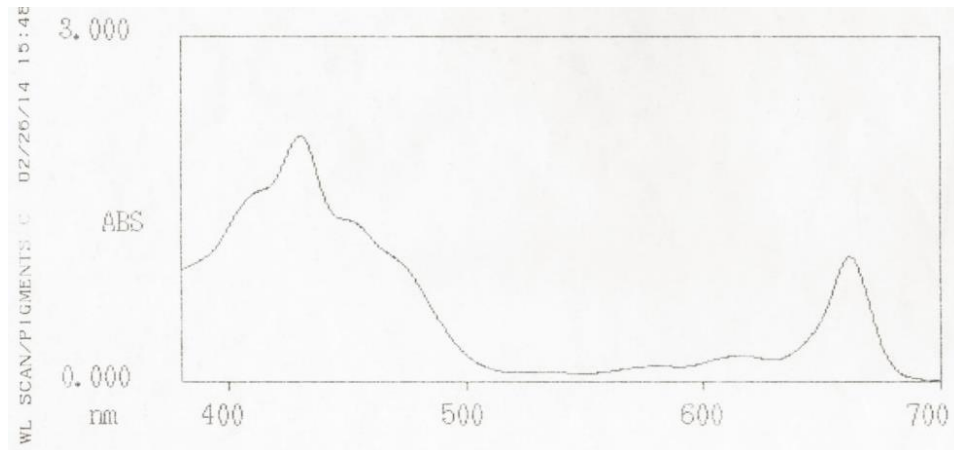


Figura 3.12 – Perfil de pigmentos totais no Consórcio C obtido no espectrofotômetro

A Figura 3.13 apresenta os resultados obtidos por cromatografia de camada fina (TLC), dos padrões e das biomassas analisadas. Os principais pigmentos detetados nas diversas microalgas foram β -caroteno, luteína e clorofilas *a* e *b*. Diversos autores referem também a existência destes vários pigmentos na *C. vulgaris* e *S. obliquus* (Seyfabadi *et al.*, 2011; Wiltshire *et al.*, 2000; Gouveia *et al.*, 1996).

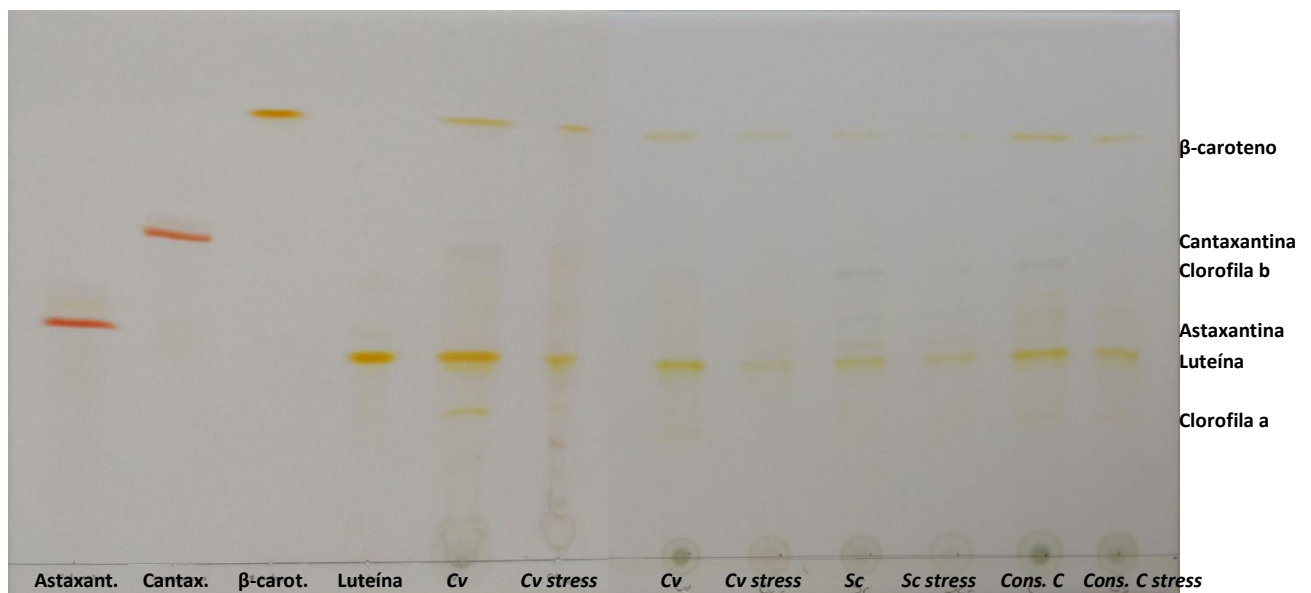


Figura 3.13 – Resultado da cromatografia em camada fina (Astaxant: Astaxantina; Cantax.: Cantaxantina; β -carot.: β -caroteno; Cv: *C. vulgaris*; Sc: *S. obliquus*; Cons. C: Consórcio C)

O conteúdo em clorofilas da *C. vulgaris* é um dos mais elevados na natureza (Seyfabadi *et al.*, 2011). Por outro lado, o seu conteúdo nos restantes pigmentos varia consideravelmente em função do ambiente e das condições de crescimento. A não existência de pigmentos secundários, como cantaxantina e astaxantina, evidencia que esta microalga não foi sujeita a nenhum estímulo ambiental durante o crescimento que a levasse a submeter-se a carotenogénese (Inbaraj *et al.*, 2006; Gouveia *et al.*, 1996).

3.5 Caracterização da Fração Lipídica

3.5.1 Composição em Ácidos Gordos

O perfil de ácidos gordos foi determinado para as três microalgas nos dois estados de desenvolvimento e é apresentado na Tabela 3.5. No cromatógrafo foram obtidos vários perfis, onde cada pico corresponde a um tipo de ácido gordo presente no óleo analisado, como pode ser constatado na Figura 3.14.

Tabela 3.5 – Ácidos gordos presentes nos extratos de óleo de *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus obliquus* (Sc) e Consórcio C (Cons. C)

Ácidos Gordos	Cv (% p/p)	Cv stress (% p/p)	Sc (% p/p)	Sc stress (% p/p)	Cons. C (% p/p)	Cons. C stress (% p/p)
C8:0	0,15	n.d.	0,40	0,37	0,12	
C10:0	0,07	0,51	0,27	0,33	0,04	0,28
C11:0	0,21	n.d.	n.d.	n.d.	0,37	n.d.
C12:0	0,05	n.d.	n.d.	n.d.	0,03	0,09
C13:0	0,10	n.d.	n.d.	n.d.	0,09	n.d.
C14:0	0,61	0,54	2,35	0,42	0,41	0,64
C14:1	2,39	n.d.	n.d.	n.d.	3,28	n.d.
C15:0	0,65	n.d.	n.d.	n.d.	0,27	n.d.
C15:1	0,12	n.d.	n.d.	n.d.	0,03	n.d.
C16:0	20,0	24,01	36,9	27,21	18,7	21,35
C16:1	1,39	2,38	1,93	2,32	0,45	2,65
C17:0	0,43	0,66	1,23	n.d.	0,21	0,36
C17:1	0,31	n.d.	n.d.	n.d.	0,10	n.d.
C18:0	1,32	1,97	5,80	3,00	1,31	1,70
C18:1	13,3	27,51	18,9	40,95	11,9	21,76
C18:2	12,9	10,06	5,48	7,91	13,1	6,79
C18:3	22,8	17,04	6,65	11,12	19,1	20,34
C20:0	1,19	2,81	n.d.	0,90	2,37	3,15
C20:1	0,30	n.d.	n.d.	n.d.	0,59	n.d.
C20:2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,14	n.d.
C20:4	0,82	n.d.	n.d.	n.d.	0,16	n.d.
C22:0	0,52	n.d.	13,3	n.d.	n.d.	0,81
C24:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,19	n.d.
Outros	20,3	12,50	6,80	5,47	27,0	20,08
Saturados	25,3	30,50	60,3	32,24	24,1	28,38
Insaturados	54,3	57,00	32,9	62,29	48,9	51,54

Nota: n.d. = não detetado

A composição dos ácidos gordos das diversas frações lipídicas extraídas das biomassas é principalmente uma mistura de ácidos gordos insaturados, entre 50 a 60%, excetuando a da biomassa de *Sc normal*, na qual 60,3% eram ácidos gordos saturados. O ácido palmítico (C16:0) ocorre numa percentagem significativa em todas as frações lipídicas analisadas, sendo de 19 a 24% para Cv e Cons. C e de 37 e 27% para Sc e Sc stress, respetivamente. Entre os vários ácidos gordos insaturados o oleico (C18:1) é aquele que apresenta conteúdo mais elevado para as três algas em situação de stress e para Sc. Para Cv e Cons. C o ácido linolénico (C18:3) é o ácido gordo insaturado que se encontra em maior quantidade. De acordo com a norma EN 14214, que especifica para o biodiesel um limite de 12% de ácido linolénico e 1% de ácidos gordos poli-insaturados (com ≥ 4 ligações duplas), as microalgas Sc e

Sc stress cumprem essa norma europeia, no entanto, *Cv* e *Cons. C* não cumprem as especificações pelo que teriam de ser utilizadas em mistura com outros óleos.

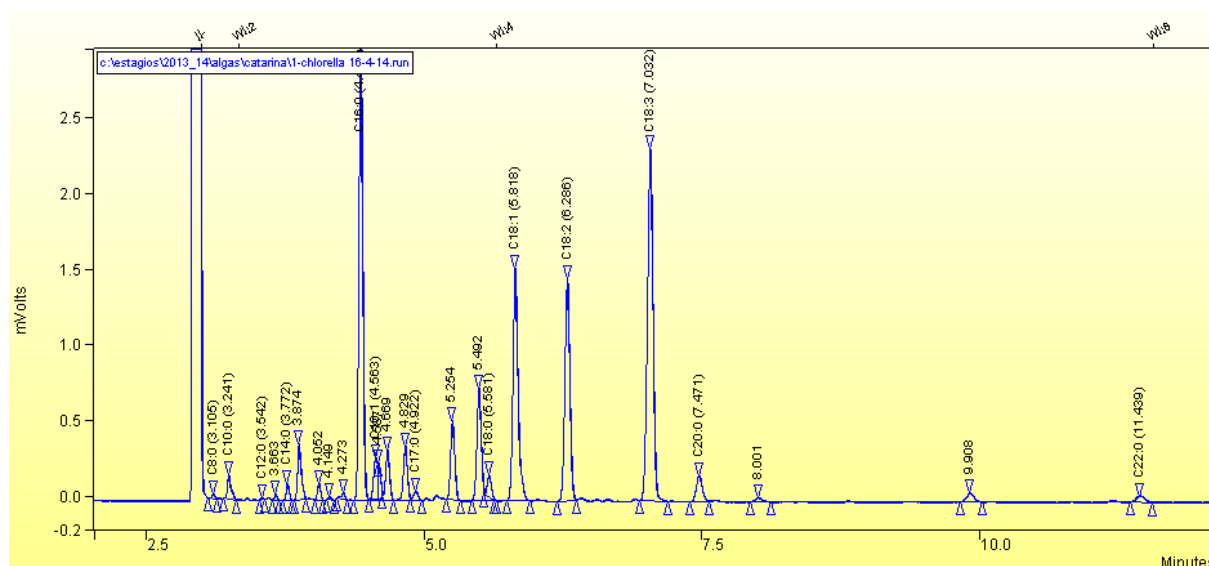


Figura 3.14 – Perfil de ácidos gordos no óleo da *Chlorella vulgaris* obtido por cromatografia gasosa

As quantidades relativas de ácidos gordos detetadas por outros investigadores são semelhantes às encontradas neste estudo. Por exemplo, a *S. obliquus* produzida em águas residuais é descrita por Martinez *et al.* (2000) com uma relação entre os ácidos gordos palmítico, oleico e linolénico muito idêntica. Um estudo com efluente de suinicultura, sem indução de *stress*, obteve 26%, 19%, 17% e 24% para C16:0, C18:1, C18:2 e C18:3, respetivamente para a *C. vulgaris*, valores muito próximos dos obtidos no presente estudo. Contudo, para a *S. obliquus* os valores diferem mais, sendo 24%, 15%, 33% e 27%, respetivamente (Abou-Shanab *et al.*, 2013). É também referida uma predominância de ácidos gordos insaturados, como ácido oleico, linolénico e linoleico, nas microalgas de um modo geral (Kirrolia *et al.*, 2013).

A deficiência ou privação de azoto no meio conduz a um aumento da produção de ácidos gordos insaturados nas microalgas *C. vulgaris* e do género *Scenedesmus* (Damiani *et al.*, 2014; He *et al.*, 2003). Esta situação verificou-se para as culturas de *Cv* e *Sc* quando comparadas as situações de produção normal com a produção em *stress*, ou seja, em situação de carência de azoto são produzidos mais ácidos gordos insaturados, como pode ser constatado na Tabela 3.5.

A composição em ácidos gordos, nomeadamente o comprimento da cadeia de carbonos e as ligações duplas, afeta diretamente as características e o desempenho do biodiesel. De notar que os FAMES mono-insaturados são considerados melhores do que os poli-insaturados devido aos valores dos índices de cetano e de iodo, não exercendo qualquer efeito adverso nas propriedades do biodiesel a frio (Damiani *et al.*, 2014).

3.5.2 Teor de Matéria Saponificável

As diferentes frações lipídicas obtidas a partir das biomassas sujeitas a moagem no moinho de bolas foram analisadas em termos da matéria saponificável presente, ou seja, da quantidade de lípidos que são passíveis de ser transformados em ésteres. Os resultados obtidos (Tabela 3.6) mostram haver uma quantidade superior de matéria saponificável na microalga *Chlorella* relativamente ao Consórcio C.

Tabela 3.6 – Teor de matéria saponificável das diversas microalgas em estudo (Cv: *C. vulgaris*; Sc: *S. obliquus*; Cons. C: Consórcio C).

	Matéria Saponificável (%)	Porcentagem de lípidos saponificáveis * (% lípidos em ps)
Cv	88,41	6,94
Cv stress	82,45	9,42
Sc	n.d.	n.d.
Sc stress	n.d.	n.d.
Cons. C	76,74	4,90
Cons. C stress	77,47	9,27

n.d. - Não foi possível fazer a determinação por falta de amostra

* - Indica o teor máximo de ésteres que pode ser obtido após reação

3.5.3 Índices de acidez e de iodo

Os índices de acidez e de iodo dos diferentes óleos obtidos encontram-se na Tabela 3.7. O índice de iodo foi calculado de duas formas (teórico e prático) para três das biomassas, podendo verificar-se que todas cumprem os requisitos da norma europeia relativamente ao índice de iodo para o biodiesel. A biomassa de Sc apresenta valores de índice de iodo muito inferiores aos restantes porque a sua composição é maioritariamente em ácidos gordos saturados ou pouco insaturados. Outros autores referem também valores próximos de 87g I₂/100g para biomassas de *Scenedesmus* sp. que estiveram sujeitos a condições de crescimento com carência de azoto (Damiani *et al.*, 2014), e valores de 68g I₂/100g para *S. obliquus* não sujeito a stress nutricional (Silva *et al.*, 2009). Apesar dos restantes valores de índices de iodo serem superiores, respeitam a especificação de qualidade do biodiesel no que concerne a este parâmetro, o que torna estes óleos competitivos com alguns dos óleos tradicionais utilizados para produzir biodiesel, como o de soja ou de girassol, que apresentam valores de iodo superiores a 120g I₂/100g (Gouveia & Oliveira, 2009).

Tabela 3.7 – Índice de acidez e índice de iodo para as várias biomassas analisadas

	Cv	Cv stress	Sc	Sc stress	Cons. C	Cons. C stress
Índice de Acidez (mg KOH/g)	130,81	93,93	n.d.	62,89	117,02	73,52
Índice de Iodo teórico (g I₂/100g)	97,23	87,93	44,93	80,20	89,64	86,21
Índice de Iodo prático (g I₂/100g)	115,78	120,35	n.d.	n.d.	n.d.	117,97

n.d. – Valores que não foram determinados por insuficiência de biomassa algal

A diferença obtida entre o cálculo teórico e prático do índice de iodo pode dever-se ao facto de existirem cerca de 20% de ésteres metílicos não identificados nessas frações lipídicas, que atendendo aos valores obtidos pelo cálculo teórico deverão ser em grande parte insaturados (não possíveis de contabilizar pelo método teórico utilizado).

Dado que o índice de iodo não é alterado pelo processo de transesterificação, é possível extrapolar o valor deste parâmetro no biodiesel obtido a partir de cada um dos óleos.

Em termos do índice de acidez, este parâmetro é importante para definir a processo catalítico a utilizar para a conversão dos lípidos em biodiesel. Neste caso, os valores obtidos para as diferentes frações lipídicas são muito elevados (Tabela 3.7), indicando uma elevada presença de ácidos gordos livres e, portanto, a catálise ácida será o processo mais adequado.

3.6 Produção de biodiesel por transesterificação direta

Nos processos industriais a transesterificação é maioritariamente realizada com recurso a catalisadores básicos. Todavia, quando o índice de acidez do óleo é superior a 2mg KOH.g^{-1} é recomendado que a transesterificação seja feita recorrendo a um catalisador ácido, como o H_2SO_4 , caso contrário os ácidos gordos livres irão saponificar e formar-se-á sabão em vez de biodiesel (Lam & Lee, 2012).

O rendimento do processo de transesterificação direta pode ser bastante elevado, tendo sido alcançadas conversões de 97% para a microalga *C. vulgaris*, através da utilização de um catalisador ácido. No mesmo estudo, com a aplicação de um catalisador alcalino o rendimento foi somente de 78% (Velasquez-Orta *et al.*, 2012).

O rendimento em biodiesel, resultante da transesterificação direta das várias biomassas em estudo, é apresentado na Tabela 3.8. Esse rendimento foi calculado por comparação com a percentagem de ésteres metílicos obtida no processo moinho de bolas + Soxhlet (exceto para *Sc* e *Sc stress* onde se comparou com a percentagem de óleo obtida no processo moinho de bolas + Soxhlet).

De acordo com os resultados obtidos, podemos inferir que é possível obter ésteres metílicos (biodiesel) a partir de biomassa algal por transesterificação direta. Contudo, o rendimento obtido para as biomassas *Cv* e *Sc stress* situou-se abaixo dos 75% o que poderá indicar que seria necessário que o tempo da reação de transesterificação fosse superior às 4 horas de reação utilizadas nestes ensaios.

Tabela 3.8 – Percentagem de ésteres metílicos produzidos a partir das biomassas microalgais de *Cv*, *Sc* e *Cons. C* através do processo de transesterificação direta (Condições: 100mg de biomassa moída em moinho de bolas, tempo de reação de 4h, 4 mL de metanol, 1,2% de ácido sulfúrico, 55°C e 200rpm) e respetivos rendimentos (valores médios \pm desvio padrão, expressos em % ps).

	Percentagem de Ésteres Metílicos (%)	Rendimento da Transesterificação Direta (%)
<i>Cv</i>	$5,13 \pm 0,14$	$73,87 \pm 1,97$
<i>Cv stress</i>	$9,88 \pm 0,07$	$104,91 \pm 0,80$
<i>Sc</i>	$6,35 \pm 0,71$	$89,17 \pm 1,83$
<i>Sc stress</i>	$13,60 \pm 0,12$	$56,54 \pm 0,49$
<i>Cons. C</i>	$11,08 \pm 0,01$	$226,03 \pm 0,22$
<i>Cons. C stress</i>	$9,28 \pm 2,72$	$100,09 \pm 2,37$

Também para a *Sc* as 4h de reação não foram suficientes para se atingir o máximo de conversão. Por outro lado, para as restantes biomassas, nomeadamente *Cv stress* e *Cons. C stress*, esse tempo parece ter sido suficiente para transesterificar todos os ácidos gordos. O rendimento superior a 100% observado para estas biomassas pode ser explicado pelo facto de se estar a comparar com os valores obtidos no processo moinho de bolas + Soxhlet que, como foi referido anteriormente, não possibilitou a extração de todos os lípidos na biomassa. Por outro lado, o processo de transesterificação direta (com ácido sulfúrico e metanol) pode ter conduzido à libertação de fosfolípidos das membranas das células das microalgas, compostos que não são obtidos no processo convencional de extração com hexano. Esta situação é relatada por Wahlen *et al.*, (2011). Relativamente à biomassa de *Cons. C*, esta apresenta um rendimento muito superior a 100%, valor não admissível e indicativo da necessidade de repetição do ensaio, o que não foi possível por indisponibilidade de biomassa desta microalga.

Para aumentar o rendimento da transesterificação *in situ*, seria necessário testar outros tempos de reação e eventualmente outras proporções de reagentes, de modo a otimizar este processo para cada uma das algas testadas.

3.7 Produção de Biohidrogénio

A cinética de fermentação (no escuro) da biomassa microalgal com a *Enterobacter aerogenes*, em termos de produção de H_2 , foi monitorizada durante 8 horas e os resultados encontram-se na Figura 3.15. O comportamento observado é tipicamente de produção cumulativa de hidrogénio, com uma fase *lag* inicial, seguida de um rápido incremento (exponencial) em produção de bio H_2 e finalmente uma fase estacionária que ocorreu entre as 4-5 horas, para todas as microalgas. Este comportamento apresenta muitas vantagens por necessitar de um curto tempo de processamento, em comparação com outros organismos fermentativos, nomeadamente bactérias anaeróbias estritas como o *Clostridium butyricum* (Batista *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2013).

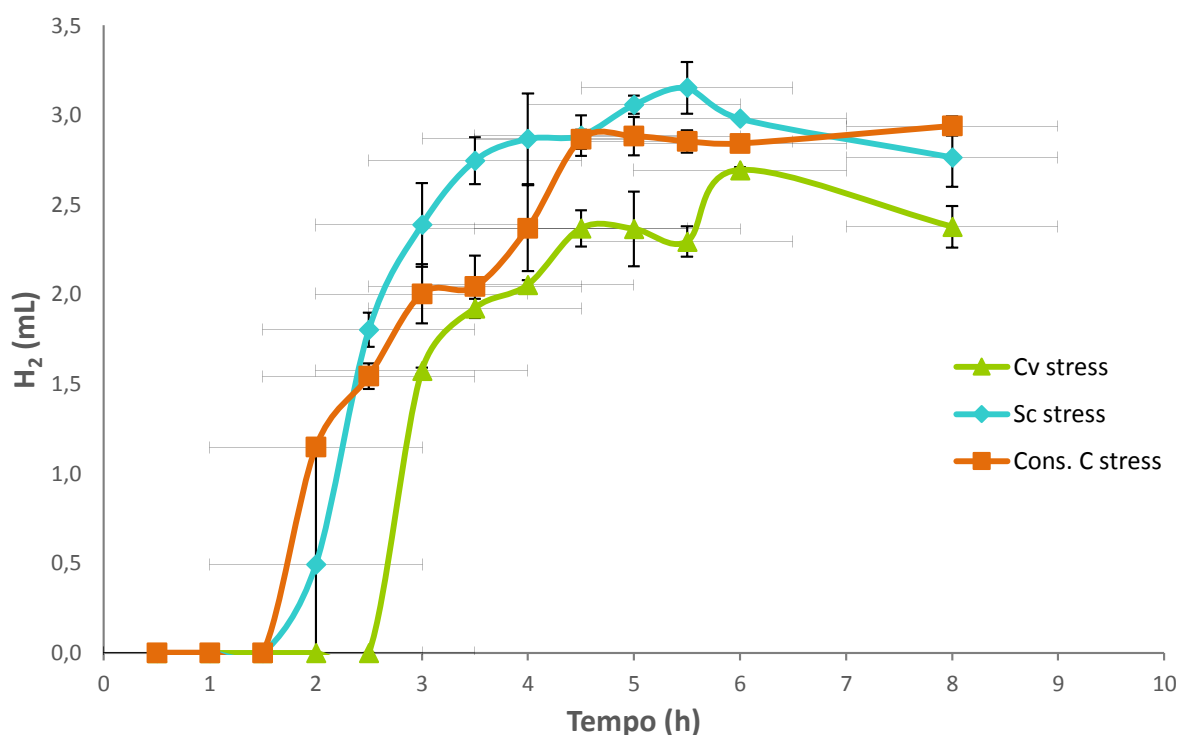


Figura 3.15 – Cinética de fermentação de microalgas por *Enterobacter aerogenes* para produção de bio H_2

Os dados experimentais foram ajustados ao modelo Gompertz modificado (Zwietering *et al.*, 2013) que tem sido amplamente usado para descrever o perfil de produção fermentativa de bio H_2 . A equação pode ser expressa por:

$$\text{Equação 9} \quad H(t) = H \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_m \times e}{H} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

Onde $H(t)$ representa o volume cumulativo de produção de hidrogénio (mL), H a produção potencial máxima de hidrogénio (mL), R_m a taxa de produção máxima (mL/h), λ a duração da fase *lag* (h), t o tempo de incubação (h) e e a $\exp(1)$ (2,71828).

Observou-se um bom ajustamento do modelo (Figura 3.16), para todos os dados ($R^2 > 0,978$), como pode ser confirmado na Tabela 3.9.

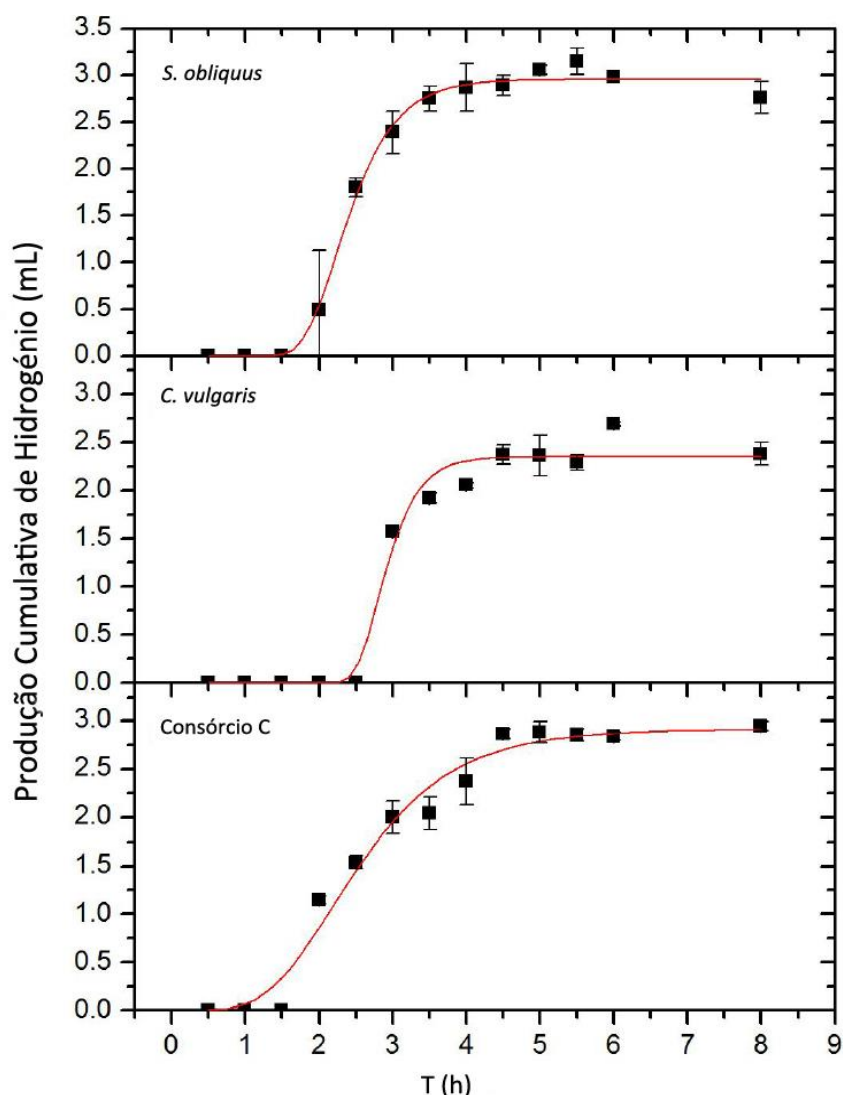


Figura 3.16 – Cinética de fermentação da biomassa microalgal por *E. aerogenes* para a produção de bioH₂. A linha vermelha corresponde ao ajuste com o modelo de Gompertz.

Tabela 3.9 – Parâmetros de ajustamento do modelo modificado de Gompertz. Valores médios \pm desvio padrão.

	<i>H</i> (mL)	<i>R_m</i> (mL/h)	λ (h)	<i>R</i> ²	Chi ²
<i>Chlorella vulgaris</i>	2,35 \pm 0,08	2,87 \pm 0,68	2,50 \pm 0,11	0,9820	0,0283
<i>Scenedesmus obliquus</i>	2,96 \pm 0,04	2,44 \pm 0,24	1,79 \pm 0,06	0,9945	0,0113
Consórcio C	2,91 \pm 0,11	1,20 \pm 0,17	1,28 \pm 0,17	0,9778	0,0365

O valor mais elevado para a produção potencial máxima de hidrogénio verificou-se para a microalga *S. obliquus* (2,96mL), o que pode ser atribuído ao seu alto teor em açúcar (41% ps). Contudo, o Consórcio C apresentou um valor muito similar (2,91mL) o que é vantajoso considerando que estas microalgas ocorrem naturalmente no efluente, estando mais adaptadas a este. Este valor deve-se, provavelmente, a esta microalga possuir um teor de sólidos voláteis muito elevado.

A *C. vulgaris* exibiu a taxa mais elevada de produção de bioH₂ (2,9 mL/h), mas a fase *lag* foi muito mais longa ($\lambda = 2,5$ h) e o volume cumulativo final de bioH₂ foi mais baixo (2,35mL) do que para as restantes microalgas. Por outro lado, o Consórcio C começou a produção de bioH₂ mais cedo ($\lambda = 1,3$ h) mas a uma taxa mais lenta (1,2mL/h). A produção específica de hidrogénio para cada uma das biomassas de microalgas encontra-se representada na Figura 3.17. Este parâmetro foi calculado dividindo *H* (derivado da eq. 8) pelo conteúdo de sólidos voláteis (SV) da biomassa algal.

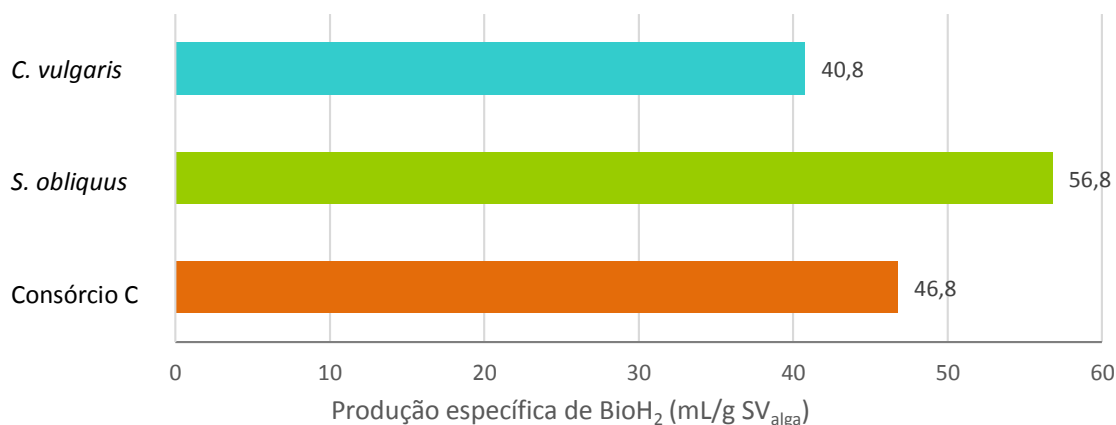


Figura 3.17 – Produção específica de bioH₂ obtida da fermentação da biomassa microalgal por *E. aerogenes*

O valor de 56,8mL H₂/g SV para *S. obliquus* tem a mesma magnitude do descrito por Batista *et al.* (2014) de 57,6mL H₂/g SV, quando foi utilizado um meio de cultura sintético para o crescimento da alga. Este resultado conduz a uma vantagem óbvia do ponto de vista económico e ambiental.

A produção máxima específica atingida por *C. vulgaris* (40,8mL H₂/g SV) foi consideravelmente mais elevada do que a descrita por Lakaniemi *et al.* (2011), de 10,8mL H₂/g SV, usando lamas de digestão anaeróbia como inóculo. Contudo, utilizando *Clostridium* como bactéria fermentativa foi obtido o valor de 81mL H₂/g ps por Liu *et al.* (2012) e 103mL H₂/g SV por Batista *et al.* (2014). O Consórcio C apresentou um rendimento de produção específica mais elevado (46,8mL H₂/g SV) do que *C. vulgaris*.

A fermentação no escuro por bactérias entéricas é um processo de conversão de açúcares e/ou resíduos orgânicos em produtos como etanol, ácidos gordos voláteis, dióxido de carbono e hidrogénio (Hallenbeck, 2005). A proporção relativa destes produtos depende da natureza do substrato e das condições de operação. No presente trabalho a evolução da composição da fase líquida, ao longo da fermentação foi acompanhada e encontra-se expressa na Figura 3.18.

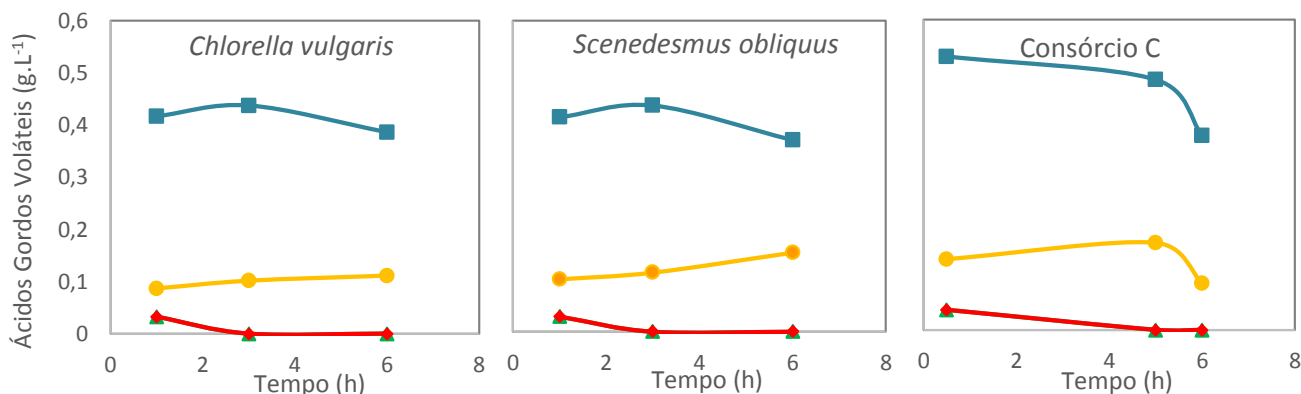


Figura 3.18 – Evolução dos ácidos succínico (●), láctico (▲), fórmico (◆) e propanoico (■), ao longo da fermentação da biomassa algal por *E. aerogenes*

Verificou-se o consumo dos ácidos láctico, fórmico e propanoico assim como a produção de ácido succínico pela bactéria *Enterobacter aerogenes*, para todas as biomassas microalgais testadas. Não foi detetada a produção de etanol, o que sugere que o metabolismo foi desviado para a via do formiato (maior rendimento de H_2 e CO_2) em vez da via da acetil-CoA (maior rendimento de etanol e acetato) (Hallenbeck, 2005).

4. Conclusões

A água é um bem precioso e um recurso cada vez mais escasso, essencial para todos os ecossistemas e seres humanos. O tratamento das águas residuais é fundamental e a utilização das microalgas nesse processo constitui uma tecnologia simples, eficiente, sustentável e económica. A vantagem acrescida de produzir uma biomassa valorizável, da qual resultem compostos de elevado valor e biocombustíveis, poderá ser uma opção tecnológica do futuro. Este processo origina uma alternativa muito atrativa ao método convencional de tratamento das águas residuais, fornecendo produtos que podem ser encaminhados para a produção de biocombustíveis, indústria alimentar, indústria farmacêutica e agricultura.

Neste estudo demonstrou-se que as diferentes microalgas utilizadas (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* e Consórcio C – isolado a partir do próprio efluente) são eficientes na remoção dos nutrientes das águas residuais, possibilitando a sua descarga em reservatórios naturais de água. Foram alcançadas remoções de azoto total e fósforo de 84% e 95%, de 95% e 92% e de 98% e 100% para *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* e Consórcio C, respetivamente. Complementarmente, foram alcançadas produtividades elevadas de biomassa, superiores às referenciadas na literatura, nas microalgas *Sc* e *Cons. C*, $0,98\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e $0,90\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, respetivamente. Para *Cv* obtiveram-se produtividades máximas de $0,38\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$.

O tratamento de águas residuais com a produção de biomassa algal melhora significativamente a economia dos processos (de tratamento e de produção) e reduz as emissões de gases com efeito de estufa.

A microalga *Sc*, depois de tratar o efluente residual e ser sujeita a *stress*, foi a que apresentou maior teor em lípidos e hidratos de carbono, revelando ser a mais adequada para a produção de biohidrogénio ($56,8\text{mL H}_2/\text{g SV}$) e biodiesel ($0,24\text{g óleo/g peso seco}$). Adicionalmente, à semelhança da *Chlorella*, também evidenciou ter um bom teor de pigmentos (cerca de 1%), principalmente luteína e β -caroteno, cujo valor comercial é de realçar até porque nos últimos anos têm surgido diversas aplicações destes compostos para a saúde humana.

O teor elevado em proteína, presente nas microalgas *Cv*, *Cons. C* e *Cons. C stress*, poderia ser canalizado para a alimentação animal, contudo, a produção de biocompósitos e bioplásticos a partir da biomassa microalgal constitui também uma alternativa muito desejável.

A utilização de técnicas não convencionais para a colheita e secagem da biomassa microalgal tem impactos muito positivos, tanto no balanço energético, como no económico. Neste trabalho, o ensaio de eletrocoagulação resultou numa diminuição de 94,2% de energia, por comparação com o método convencional de centrifugação. Também a utilização do secador solar permitiu a secagem da biomassa sem qualquer gasto energético associado, por comparação com as alternativas convencionais de secagem em estufa ou no liofilizador, com a vantagem adicional de ser um processo bastante rápido (4-5h). Apresenta apenas a limitação de só poder ser utilizado aquando da presença do sol (raios solares diretos).

Os resultados do presente trabalho sugerem que a microalga *Scenedesmus obliquus* é a candidata mais promissora para a simultânea remoção de nutrientes dos efluentes residuais urbanos e produção de biodiesel, biohidrogénio e compostos de elevado valor acrescentado, como pigmentos.

Num futuro próximo, a investigação com microalgas para fins energéticos em larga escala, e dado que não compete com as culturas alimentares, deve concentrar-se em continuar a reduzir os custos associados com a produção (ex., uso de efluentes líquidos e gasosos, melhor *design* dos

reatores), colheita, secagem e conversão da biomassa. A otimização e seleção de estirpes e o uso do potencial total da biomassa (conceito de biorrefinaria) devem também ser áreas chave para tornar mais rentável e sustentável a produção de biocombustíveis a partir de microalgas.

5. Referências Bibliográficas

- Abdelaziz, A.E., Leite, G.B. e Hallenbeck, P.C. (2013A); Addressing the challenges for sustainable production of algal biofuels: I. Algal strains and nutrient supply; *Environmental Technology*, Vol. 34, Nos. 13–14, 1783-1805
- Abdelaziz, A.E., Leite, G.B. e Hallenbeck, P.C. (2013B); Addressing the challenges for sustainable production of algal biofuels: II. Harvesting and conversion to biofuels, *Environmental Technology*, Vol. 34, Nos. 13–14, 1807-1836
- Abrahamsson, V., Rodriguez-Meizoso, I. e Turner, C. (2012); Determination of carotenoids in microalgae using supercritical fluid extraction and chromatography; *Journal of Chromatography A*, 1250: 63-68
- Álvarez, S., Zapata, M., Garrido, J.L. e Vaz, B. (2012); Characterization of [8-ethyl]-chlorophyll c3 from *Emiliania huxleyi*; *Chemical Communications*, 48: 5500-5502
- Amaro, H.M., Guedes, A.C. e Malcata, F.X. (2011); Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel; *Applied Energy*, 88: 3402-3410
- Antelo, F.S., Costa, J.A. e Kalil, S.J. (2008); Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis*; *Biochemical Engineering Journal*, 41: 43-47
- AOAC Official methods of analysis, 18th edition, Association of Official Analytical Chemists (2006)
- Arbib, Z., Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P., Garrido-Pérez, C. e Perales, J. (2014); Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: Wastewater tertiary treatment, CO₂ bio-fixation and low cost biofuels production, *Water Research*, 49 (1): 465-474
- Australia New Zealand Food Standards Code - Standard 1.2.4 - Labelling of Ingredients, Retrieved 5 December 2013
- Batista, A.P., Gouveia, L., Bandarra, N., Franco, J., Raimundo, A. (2013); Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products, *Algal Research*, 2 (2): 164-173
- Batista, A.P., Moura, P., Marques, P.S, Ortigueira, J., Alves, L. e Gouveia, L. (2014); *Scenedesmus obliquus* as feedstock for biohydrogen production by *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*; *Fuel*, 117: 537-543
- Becker, E.W., In: Baddiley *et al.*, editors. (1994) *Microalgae: biotechnology and microbiology*, Cambridge University Press, 293 pp, ISBN 0-521-35020-4
- Borghini, F., Colacevich, A., Bergamino, N., Micarelli, P., Dattilo, A.M., Focardi, S., Focardi S. e Loisel, S.A. (2009); The microalgae *Tetraselmis suecica* in mesocosms under different light regimes; *Chemistry and Ecology*, 25 (5): 345-357
- Brown, M.R. & Farmer, C.L (1994); Riboflavin content of six species of microalgae used in mariculture; *Journal of Applied Phycology*, 6: 61-65
- Burr, G.O., Burr, M. M. e Miller, E. S. (1932); On the fatty acids essential in nutrition. III; *Journal of Biological Chemistry*, 97: 1-9
- Campenni', L., Nobre, B., Santos, C., Oliveira, A.C., Aires-Barros, M.R., Palavra, A. M. e Gouveia, L. (2013); Carotenoid and lipid production by the autotrophic microalga *Chlorella protothecoides* under nutritional, salinity, and luminosity stress conditions; *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 1383–1393
- Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advances*, 25: 294-306

- Chisti, Y. (2008); Response to Reijnders: Do biofuels from microalgae beat biofuels from terrestrial plants?; *Trends in Biotechnology*, 26 (7): 351-352
- Choi, J., Hwang, J., Dempsey, B., Abou-Shanab, R., Min, B., Song, H., Lee, D., Kim, J., Cho, Y., Hong, S. e Jeon, B. (2011); Enhancement of fermentative bioenergy (ethanol/hydrogen) production using ultrasonication of *Scenedesmus obliquus* YSW15 cultivated in swine wastewater effluente; *Energy and Environmental Science*, 4: 3513-3520
- Clarens, A.F., Resurreccion, E.P., White, M.A. e Colosi, L.M. (2010); Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks. *Environmental Science & Technology*, 44: 1813-1819
- Collet, P., Hélias, A., Lardon, L., Ras, M., Goy, R. e Steyer, J. (2011); Lifecycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production. *Bioresource Technology*, 102: 207-214
- Cooney, M., Young, G. e Nagle, N. (2009); Extraction of Bio-oils from Microalgae; *Separation & Purification Reviews*, 38: 291-325
- Cordero, B.F., Couso, I., Leon, R., Rodriguez, H., e Vargas, M.A. (2012); Isolation and Characterization of a Lycopene ϵ -Cyclase Gene of *Chlorella (Chromochloris) zofingiensis*. Regulation of the Carotenogenic Pathway by Nitrogen and Light; *Marine Drugs*, 10: 2069-2088
- D'Oca, M.G., Viêgas, C.V., Lemões, J.S., Miyasaki, E.K., Morón-Villarreyes, J.A., Primel, E.G. e Abreu, P.C. (2011); Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*; *Biomass and Bioenergy*, 35: 1533-1538
- Damiani, M., Popovich, C., Constenla, D. e Leonardi, P. (2010); Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock; *Bioresource Technology*, 101: 3801-3807
- Damiani, M., Popovich, C., Constenla, D. Martínez, A., Doria, E., Longoni P., Cella, R., Nielsen, E. e Leonardi, P. (2014); Triacylglycerol content, productivity and fatty acid profile in *Scenedesmus acutus* PVUW12; *Journal of Applied Phycology*, 26 (3): 1423-1430
- de Godos, I., Guzman, H.O., Soto, R., García-Encina, P.A., Becares, E., Muñoz, R. e Vargas, V.A. (2011); Coagulation/flocculation-based removal of algal-bacterial biomass from piggery wastewater treatment, *Bioresource Technology*, 102(2): 923-927
- DEMA Consortium (Direct Ethanol from MicroAlgae) (2012); Community Research and Development Information Service (CORDIS), European Commission. http://cordis.europa.eu/project/rcn/106280_en.html
- Demirbas, A. (2010) Use of algae as biofuel sources, *Energy Conversion and Management*, 51: 2738-2749
- Demirbas, M.F. (2011); Biofuels from algae for sustainable development; *Applied Energy*, 88: 3473-3480
- Diário da República – I Série – A, Decreto de lei nº 176 – 1-8-1998, Anexo XVIII, pág. 3717 (1998)
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. e Smith, F. (1956); Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*, 28 (3): 360-356
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S., Blanc, P., Murthy, K. e Ravishankar, G. (2005); Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?; *Trends in Food Science & Technology*, 16: 389–406
- Ehimen, E.A., Sun, Z.F. e Carrington, C.G. (2010); Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids; *Fuel*, 89: 677-684

- Ehimen, E.A., Sun, Z.F., Carrington, C.G., Birch, E.J., Eaton-Rye, J.J. (2011); Anaerobic digestion of microalgae residues resulting from the biodiesel production process. *Applied Energy*, 88: 3454-3463
- El-Sheekh, M., Abomohra, A., Hanelt, D. (2013); Optimization of biomass and fatty acid productivity of *Scenedesmus obliquus* as a promising microalga for biodiesel production; *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29: 915–922
- EN 14103: 2003, European Standard EN 14103; Fat and oil derivatives – Fatty acid methyl esters (FAME) – determination of ester and linolenic acid methyl ester contents (2003).
- EN 14111: 2003, European Standard EN 14111; Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of iodine value.
- EN 16300:2013 Automotive fuels - Determination of iodine value in fatty acid methyl esters (FAME) - Calculation method from gas chromatographic data
- EN ISO 5509: 2000, Animal and vegetable fats and oils – Preparation of methyl esters of fatty acids (2000)
- European Commission, European Union Register of Feed Additives, Revision 162, Retrieved -21 June 2013
- Ferreira, A.F., Marques, A.C., Batista, A.P., Marques, P.A., Gouveia, L. e Silva, C.M. (2012); Biological hydrogen production by *Anabaena* sp. e Yield, energy and CO₂ analysis including fermentative biomass recovery; *International Journal of Hydrogen Energy*, 37 (1): 179-190
- Ferreira, A.F., Ribeiro, L.A., Batista, A.P., Marques, P.S., Nobre, B.P., Palavra, A.F., Silva, P.P., Gouveia, L. e Silva, C. (2013); A Biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga – Energy and CO₂ emission and economic analyses, *Bioresource Technology*, 138: 235-244
- Ferreira, A., Pacheco, R., Pinto, T., Nobre, B., Loureiro, D., Moura, P., Gouveia, L.; Silva, C. (2014); The production of pigments & hydrogen through a *Spirogyra* sp. Biorefinery; Submetido *Energy Conversion and Management*
- Fradique, M., Batista, A.P., Nunes, M.C., Gouveia, L., Bandarra, N.M. e Raymundo, A. (2010); Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: Preparation and evaluation; *Journal of Science of Food and Agriculture*, 90: 1656-1664
- Fradique, M., Batista, A.P., Nunes, M.C., Gouveia, L., Bandarra, N.M. e Raymundo, A. (2013); *Isochrysis galbana* and *Diatrypa vlnianum* biomass incorporation in pasta products as PUFA's source; *LWT - Food Science and Technology*, 50: 312-319
- Gallagher, B. (2011) The economics of producing biodiesel from algae, *Renewable Energy*, 36: 158-162
- Gao, S., Du, M., Tian, J., Yang, J., Yang, J., Ma, F. e Nan J. (2010); Effects of chloride ions on electro-coagulation-flotation process with aluminium electrodes for algae removal, *Journal of Hazardous Materials*, 182: 827-834
- Gouveia, L., Veloso, V., Reis, A., Fernandes, H., Novais J. e Empis, J. (1996); Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*; *Bioresource Technology*, 57: 157-163
- Gouveia, L. e Empis, J. (2003); Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed: effect of storage conditions, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4 (2): 227-233
- Gouveia, L., Raymundo, A., Batista, A.P., Sousa, I. e Empis, J. (2006); *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions; *European Food Research and Technology*, 222: 362-367

- Gouveia, L., Batista, A.P., Miranda, A., Empis, J. e Raymundo, A. (2007); *Chlorella vulgaris* biomass used as colouring source in traditional butter cookies; *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8: 433-436
- Gouveia, L., Coutinho, C., Mendonça, E., Batista, A.P., Sousa, I., Bandarra, N.M. e Raymundo, A. (2008); Functional biscuits with PUFA- ω 3 from *Isochrysis galbana*; *Journal of Science of Food and Agriculture*, 88: 891-896
- Gouveia, L. e Oliveira, A.C. (2009); Microalgae as a raw material for biofuels production; *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36 (2): 269-274
- Gouveia, L., Marques, A.E., Silva, T.L., Reis, A. (2009); *Neochloris oleabundans* UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production; *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36 (6): 821-826
- Gouveia, L., Janelas, J., Tropecêlo, A. e Oliveira, A. C. (2014); Biodiesel production by in situ transesterification of *Nannochloropsis* sp. Biomass, *Biotechnology Progress* (submetido)
- Graça, S., Sousa, C., Ambrosano, L., Hall, L., Oliveira, A.C., Ribeiro, B., Gouveia, L. (2014); Production of valuable microalgal biomass by treating Urban Wastewater. *Algal Research* (submetido - Ref. No.: ALGAL-D-14-00148)
- Grama, B.S., Chader, S., Khelifi, D., Agathos, S.N., Jeffryes, C. (2014); Induction of canthaxanthin production in a *Dactylococcus* microalga isolated from the Algerian Sahara; *Bioresource Technology*, 151: 297–305
- Grima, E.H., Belarbi, E.H., Fernández F.G., Medina, A.R. e Chisti, Y. (2003); Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics; *Biotechnology Advances*, 20: 491–515
- Hallenbeck, P.C. (2005); Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Science & Technology*, 52: 21-29.
- Harun, R., Danquah M. e Forde, G. (2010); Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85: 199-203
- He, P., Mao, B., Shen, C., Shao, L., Lee, D. e Chang, J. (2013); Cultivation of *Chlorella vulgaris* on wastewater containing high levels of ammonia for biodiesel production, *Bioresource Technology*, 129: 177-181
- Hempel, F., Bozarth, A.S., Lindenkamp, N., Klingl, A., Zauner, S., Linne, U., Steinbüchel, A. e Maier, U.G. (2011); Microalgae as bioreactors for bioplastic production; *Microbial Cell Factories*, 10: 81
- Herrero, M., Martín-Álvarez, P., Señoráns, F., Cifuentes, A. e Ibáñez, E. (2005); Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga; *Food Chemistry*, 93: 417-423
- Hirano, A., Ueda, R., Hirayama, S. e Ogushi, Y. (1997); CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation; *Energy*, Vol. 22, No. 2/3, 137-142
- Ho, S., Chen, C., Chang, J. (2012); Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNWN. *Bioresource Technology*, 113: 244-252.
- Ho, S., Kondo, A., Hasunuma, T., Chang, J. (2013); Engineering strategies for improving the CO₂ fixation and carbohydrate productivity of *Scenedesmus obliquus* CNW-N used for bioethanol fermentation; *Bioresource Technology*, 143: 163–171

- Hodaifa, G., Martínez, M. e Sánchez, S. (2010); Influence of temperature on growth of *Scenedesmus obliquus* in diluted olive mill wastewater as culture medium; *Engineering in Life Sciences*, 10, No. 3, 257–264
- Hoebler, C., Barry, J.L., David, A. e Delort-Laval, J. (1989); Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gas-liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37: 360-367
- IEA - International Energy Agency (2008). Bioenergy Task 42 on biorefineries: co-production of fuels, chemicals, power and materials from biomass. Minutes of the third Task meeting, Copenhagen, Denmark, 25–26 March 2007. URL: [http:// www.biorefinery.nl/ieabioenergy-task42/](http://www.biorefinery.nl/ieabioenergy-task42/)
- Iles, A. e Martin, A.N. (2013); Expanding bioplastics production: sustainable business innovation in the chemical industry; *Journal of Cleaner Production*, 45: 38-49
- Inbaraj, B.S., Chien, J.T. e Chen, B.H. (2006); Improved high performance liquid chromatographic method for determination of carotenoids in the microalga *Chlorella pyrenoidosa*; *Journal of Chromatography A*, 1102: 193-199
- IPMA – Instituto Português do Mar e da Atmosfera (2014) - <https://www.ipma.pt/pt/>
- Jácome-Pilcoa, C., Cristiani-Urbina, E., Flores-Cotera, L., Velasco-García, R., Ponce-Noyola, T. e Cañizares-Villanueva, R. (2009); Continuous Cr (VI) removal by *Scenedesmus incrassatulus* in an airlift photobioreactor, *Bioresource Technology*, 100 (8): 2388-2391
- Jaime, L., Rodríguez-Meizoso, I., Cifuentes, A., Santoyo, S., Suarez, S., Ibáñez, E., Señorans, F.J. (2010); Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids' extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae; *LWT - Food Science and Technology*, 43: 105-112
- Jarvis, E., Aquatic Species Program (ASP): Lessons Learned, National Renewable Energy Laboratory, AFOSR Workshop, Washington, D.C., February 19-21, 2008
- Ji, M., Abou-Shanab, R., Kim, S., Salama, E., Lee, S., Kabra, A., Lee, Y., Hong, S. e Jeon, B. (2013); Cultivation of microalgae species in tertiary municipal wastewater supplemented with CO₂ for nutrient removal and biomass production; *Ecological Engineering*, 58: 142-148
- Jin, E.S. e Melis, A. (2003); Microalgal Biotechnology: Carotenoid Production by the Green algae *Dunaliella salina*, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8: 331-337
- John, R.P., Anisha, G.S., Nampoothiri, K. M. e Pandey, A. (2011); Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol; *Bioresource Technology*, 102: 186-193
- Jones, D. B. (1931); Factors for converting percentages of nitrogen in food and feeds into percentages of protein, *US Department of Agriculture Circular*, 183: 1-21
- Jones, C. & Mayfield, S. (2012) Algae biofuels: versatility for the future of bioenergy, *Current Opinion in Biotechnology*, 23: 346-351
- Kirrolia, A., Bishnoi, N.R., Singh, R. (2013); Microalgae as a boon for sustainable energy production and its future research & development aspects; *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 20: 642-656
- Koo, S.Y., Cha, K.H., Song D.G., Chung, D. e Pan, C.H. (2012); Optimization of pressurized liquid extraction of zeaxanthin from *Chlorella ellipsoidea*; *Journal of Applied Phycology*, 24: 725-730
- Kühl, M., Chen, M., Ralph, P.J., Schreiber, U., Larkum, A.W.D. (2005); A niche for cyanobacteria containing chlorophyll *d*; *Nature*, 433, pp.820

- Kwak, H.W., Kang, M.J., Bae, J.H., Hur, S.B., Kim, I.S., Park, Y.H. e Lee, K.H. (2014); Fabrication of *Phaeodactylum tricornutum* extract-loaded gelatin nanofibrous mats exhibiting antimicrobial activity; *International Journal of Biological Macromolecules*, 63: 198-204
- Lakaniemi, A.M., Hulatt, C.J., Thomas, D.N., Tuovinen, O.H., Puhakka, J.A., (2011); Biogenic hydrogen and methane production from *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Biotechnololy for Biofuel*, 4 (34): 1-12.
- Lam, M.K. e Lee, K.T. (2012); Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward, *Biotechnology Advances*, 30: 673-690
- Laycock, B., Halley, P., Pratt, S., Werker, A. e Lant, P. (2013); The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates; *Progress in Polymer Science*, 38: 536-583
- Lee, Y.K. (1986); Enclosed bioreactors for the mass cultivation of photosynthetic microorganisms: the future trend; *Trends in Biotechnology*, 4: 186-189
- Lee, S., Go, S., Jeong, G. e Kim, S. (2011); Oil Production from Five Marine Microalgae for the Production of Biodiesel, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16: 561-566
- Lee, A.K., Lewis, D. M. e Ashman, P. J. (2012); Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements, *Biomass and Bioenergy*, 46: 89-101
- Lee, O., Kim, A., Seong, D., Lee, C., Jung, Y., Lee, J. e Lee, E. (2013); Chemo-enzymatic saccharification and bioethanol fermentation of lipid-extracted residual biomass of the microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, 132: 197–201
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C.Q. e Dubois-Calero, N. (2008); Biofuels from microalgae, *Biotechnology Progress*, 24 (4): 815-20.
- Li, Y., Lin, Y., Loughlin P.C. Chen, M. (2014); Optimization and effects of different culture conditions on growth of *Halomicronema hongdechloris* – a filamentous cyanobacterium containing chlorophyll *f*; *Frontiers in Plant Science*, Vol. 5, Art. 67
- Liu, C.H., Chang, C.Y., Cheng, C.L., Lee, D.J., Chang, J.S. (2012); Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* CGS5 using carbohydrate-rich microalgal biomass as feedstock. *International Journal Hydrogen Energy*, 37: 15458-15464.
- Liu, J., Huang, J. Jiang, Y. e Chen, F. (2012); Molasses-based growth and production of oil and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology*, 107: 393-398
- Lopez-Llorca, L., Colom-Valiente, M. e Carcases, M. (1994); Study of biofouling of Polyhydroxy-alkanoate (PHA) films in water by scanning electron microscopy; *Micron*, 25(1): 45-51
- Macías-Sánchez, M.D., Fernandez-Sevilla, J.M., Fernández, F.G. García, M.C. e Grima E.M. (2010); Supercritical fluid extraction of carotenoids from *Scenedesmus almeriensis*; *Food Chemistry*, 123: 928-935
- Malcata, F. (2011); Microalgae and biofuels: A promising partnership?; *Trends in Biotechnology*, 29 (11): 542-549
- Mandal, S. e Mallick, N. (2009); Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84: 281-291
- Martinez, M., Sánchez, S., Jiménez, J., El Yousfi, F. e Muñoz, L. (2000); Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*, *Bioresource Technology*, 73: 263-272.
- Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S. (2010); Microalgae for biodiesel production and other applications: A review; *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 217–232

- Matos, C.T., Santos, M., Nobre, B.P., Gouveia, L. (2013); *Nannochloropsis* sp. biomass recovery by Electro-Coagulation for biodiesel and pigment production; *Bioresource Technology*, 134: 219-226
- Milledge, J. J. (2011); Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review; *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 10 (1): 31-41
- Miranda, M.S., Cintra, R.G., Barros, S.B. e Mancini-Filho, J. (1998); Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*; *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31: 1075-1079
- Miranda, J., Passarinho, P. e Gouveia, L. (2012); Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production; *Bioresource Technology*, 104: 342-348
- Mostafa, S., Shalaby, E. e Mahmoud, G. (2012); Cultivating microalgae in domestic wastewater for biodiesel production. *Notulae Scientia Biologicae*, 4: 56-65
- Mussgnug, J., Klassen, V., Schlüter, A. e Kruse, O. (2010); Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept; *Journal of Biotechnology*, 150: 51-56
- Nobre, B.P., Villalobos, F., Barragán, B.E., Oliveira, A.C., Batista, A.P., Marques, P.A., Mendes, R.L., Sovová, H., Palavra, A.F. e Gouveia, L. (2013); A biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga – Extraction of oils and pigments. Production of biohydrogen from the leftover biomass; *Bioresource Technology*, 135: 128-136
- NP EN ISO 660:2002 - Óleos e gorduras animais e vegetais. Determinação do índice de acidez e da acidez (ISO 660:1999)
- Papazi, A., Andronis, E., Ioannidis, N., Chaniotakis, N. e Kotzabasis, K. (2012); High Yields of Hydrogen production induced by meta-substituted dichlorophenols biodegradation from the green alga *Scenedesmus obliquus*; *Plos One*, 7(11): e49037
- Park, J.B.K., Craggs, R.J. e Shilton, A.N. (2011); Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production, *Bioresource Technology*, 102: 35-42
- Parmar, A., Singh, N., Pandey, A., Gnansouno, E., Madamwar, D. (2011); Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels, *Bioresource Technology*, 102: 10163-10172.
- Peelman, N., Ragaert, P., Meulenaer, B., Adons, D., Peeters, R., Cardon, L., Impe, F. e Devliegher, F. (2013); Application of bioplastics for food packaging; *Trends in Food Science & Technology*, 32 (2): 128-141
- Pérez-López, P., González-García, S., Jeffries, C., Agathos, S.N., McHugh, E., Walsh, D., Murray, P., Moane, S., Feijoo, G. e Moreira, M.T. (2014); Life cycle assessment of the production of the red antioxidant carotenoid astaxanthin by microalgae: from lab to pilot scale; *Journal of Cleaner Production*, 64: 332-344
- Pires, J.C., Alvim-Ferraz, M.C., Martins, F.G. e Simões, M. (2012); Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16: 3043-3053
- Pittman, J.K., Dean, A.P. e Osundeko, O. (2011); The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources; *Bioresource Technology*, 102: 17-25
- Poelman, E., De Pauw, N. e Jeurissen, B. (1997); Potential of electrolytic flocculation for recovery of micro-algae; *Resources, Conservation and Recycling*, 19: 1-10
- Raman, R. e Mohamad, S.E.; (2012); Astaxanthin production by freshwater microalgae *Chlorella sorokiniana* and marine microalgae *Tetraselmis* sp.; *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 15 (24): 1182-1186

- Ratti, C. (2001); Hot air and freeze-drying of high-value foods: review, *Journal of Food Engineering*, 49: 311-319.
- Rawat, I., Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F. (2011); Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production, *Applied Energy*, 88: 3411-3424
- Rawat, I., Bhola, V., Kumar, R. and Bux, F. (2013); Improving the feasibility of producing biofuels from microalgae using wastewater; *Environmental Technology*, 34, Nos. 13-14, 1765-1775
- Reis, A., Mendes, A., Lobo-Fernandes, H., Empis, J.A., e Novais, J.M. (1998); Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp.; *Bioresource Technology*, 66: 181-187
- Rodolfi, L., Zittelli G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G. e Tredici, M.R. (2009); Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor, *Biotechnology and Bioengineering*, 102 (1): 100-112
- Ruangsomboon, S. (2012); Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2, *Bioresource Technology*, 109: 261-265
- Saha, S.K., McHugh, E., Hayes, J., Moane, S., Walsh, D. e Murray, P. (2013); Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*, *Bioresource Technology*, 128: 118-124
- Sander, K. e Murthy, G.S. (2010); Life cycle analysis of algae biodiesel, *International Journal of Life Cycle Assesment*, 15: 704-714
- Santiago, A.F., Calijuri, M.L., Assemany, P.P., Calijuri, M.C. e Reis, A.J. (2013); Algal biomass production and wastewater treatment in high rate algal ponds receiving disinfected effluent; *Environmental Technology*, 34, Nos. 13-14, 1877-1885
- Santos, C.A., Ferreira, M.E., Silva, T.L., Gouveia, L., Novais J.M. e Reis, A. (2011); A symbiotic gas exchange between bioreactors enhances microalgal biomass and lipid productivities: taking advantage of complementary nutritional modes; *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38: 909-917
- Sawangkeaw, R., Bunyakiat, K. e Ngamprasertsith, S. (2010); A review of laboratory-scale research on lipid conversion to biodiesel with supercritical methanol (2001–2009). *The Journal of Supercritical Fluids*, 55: 1-13.
- Seyfabadi, J., Ramezanpour Z. e Khoeyi, Z.A. (2011); Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes; *Journal of Applied Phycology*, 23: 721-726
- Sialve, B., Bernet, N. e Bernard, O. (2009); Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*, 27: 409-416
- Silva, T., Reis, A., Medeiros, R., Oliveira, C. e Gouveia, L. (2009); Oil Production Towards Biofuel from Autotrophic Microalgae Semicontinuous Cultivations Monitorized by Flow Cytometry; *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 159 (2): 568-578
- Silva, T., Gouveia, L. e Reis, A. (2014); Integrated microbial processes for biofuels and high value-added products: the way to improve the cost effectiveness of biofuel production; *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98 (3): 1043-1053
- Singh, J. e Gu, S. (2010); Commercialization potential of microalgae for biofuels production; *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 2596-2610

- Singh, R.N., Sharma, S. (2012); Development of suitable photobioreactor for algae production – A review; *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16: 2347- 2353
- Slade, R., Bauen, A. (2013); Micro-algae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects, *Biomass and Bioenergy*, 30: 1-10
- Slegers, P.M., Beveren, P.J. van, Wijffels, R.H., Straten, G. van, Boxtel, A.J. van (2013); Scenario analysis of large scale algae production in tubular Photobioreactors; *Applied Energy*, 105: 395-406
- Soares, F., Martins, G. e Seo, E. (2013); An assessment of the economic aspects of CO₂ sequestration in a route for biodiesel production from microalgae; *Environmental Technology*, 34, Nos. 13-14, 1777-1781
- Song, W., Rashid, N., Choi, W., Lee, K. (2011); Biohydrogen production by immobilized *Chlorella* sp. using cycles of oxygenic photosynthesis and anaerobiosis, *Bioresource Technology*, 102: 8676-8681
- Souto, M., Saavedra, M., Pousão-Ferreira, P. e Herrero, C. (2008); Riboflavin enrichment throughout the food chain from the marine microalga *Tetraselmis suecica* to the rotifer *Brachionus plicatilis* and to White Sea Bream (*Diplodus sargus*) and Gilthead Sea bream (*Sparus aurata*) larvae; *Aquaculture*, 283: 128-133
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. e Isambert, A. (2006); Commercial Applications of Microalgae; *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101 (2): 87-96
- Starr, R. e Zeikus, J. (1993); UTEX—the culture collection of algae at the University of Texas at Austin 1993 list of cultures, *Journal of Phycology*, 29: 1-106
- Suali, E. e Sarbatly, R. (2012); Conversion of microalgae to biofuel, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16: 4316-4342.
- Subhadra, B. e Edwards, M. (2010); Algal biofuel production using integrated renewable energy park approach in United States. *Energy Policy*, 38: 4897-4902
- Subhadra, B. e Grinson-George (2011); Algal biorefinery based industry: an approach to address fuel and food insecurity for a carbon-smart world. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 9: 2-13
- Sudesh, K., Abe, H. e Doi, Y. (2000); Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters; *Progress in Polymer Science*, 25: 1503-1555
- Talukder, M.R., Das, P. e Wu, J.C. (2012); Microalgae (*Nannochloropsis salina*) biomass to lactic acid and lipid; *Biochemical Engineering Journal*, 68: 109-113
- Toro, C., Reddy, M.M., Rivas, R.N., Misra, M. e Mohanty, A.K. (2013); Characterization and Application in Biocomposites of Residual Microalgal Biomass Generated in Third Generation Biodiesel; *Journal of Polymers and the Environment*, 21: 944-951
- U.S. Food and Drug Administration, Colour Additive Status List, Retrieved 19 October 2011
- Uduman, N., Bourniquel, V., Danquah, M. e Hoadley, A. (2011); A parametric study of electrocoagulation as a recovery process of marine microalgae for biodiesel production; *Chemical Engineering Journal*, 174: 249-257
- Vandamme, D., Pontes, S., Goiris, Ko., Foubert, I., Pinoy, L. e Muylaert, K. (2011); Evaluation of Electro-Coagulation–Flocculation for Harvesting Marine and Freshwater Microalgae; *Biotechnology and Bioengineering*, 108 (10): 2320-2329
- Velasquez-Orta, S., Lee, J. e Harvey, A. (2012); Alkaline *in situ* transesterification of *Chlorella vulgaris*; *Fuel*, 94: 544-550

- Vieira, M.G., Silva, M.A., Santos, L.O. e Beppu, M.M. (2011); Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review; *European Polymer Journal*, 47: 254-263
- Voigt, J., Stolarczyk, A., Zych, M., Malec, P. e Burczyk, J. (2014); The cell-wall glycoproteins of the green alga *Scenedesmus obliquus*. The predominant cell-wall polypeptide of *Scenedesmus obliquus* is related to the cell-wall glycoprotein gp3 of *Chlamydomonas reinhardtii*; *Plant Science*, 215 - 216: 39 - 47
- Wahlen, B., Willis, R. e Seefeldt, L. (2011); Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures; *Bioresource Technology*, 102 (2011) 2724–2730
- Wang, L., Li, Y., Sommerfeld, M. e Hu, Q. (2013); A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate or lipid; *Bioresource Technology*, 129: 289-295
- Wiltshire, K.H., Boersma, M., Möller, A., e Buhtz, H. (2000); Extraction of pigments and fatty acids from the green alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae); *Aquatic Ecology*, 34: 119-126
- Xu, L., Wang, F., Li, H., Hu, Z., Guo, C. e Liu, C. (2010); Development of an efficient electroflocculation technology integrated with dispersed-air flotation for harvesting microalgae; *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85: 1504-1507
- Yan, C., Zhang, L., Luo, X. e Zheng, Z. (2013); Effects of various LED light wavelengths and intensities on the performance of purifying synthetic domestic sewage by microalgae at different influent C/N ratios; *Ecological Engineering*, 51: 24-32
- Yu, J., Porter M. e Jaremko, M., In: Dr. Miodrag D. Matovic editors (2013); Generation and Utilization of Microbial Biomass Hydrolysates in Recovery and Production of Poly(3-hydroxybutyrate), *Biomass Now - Cultivation and Utilization*, InTech, 460pp, ISBN: 978-953-51-1106-1
- Zeller, M.A., Hunt, R., Jones, A. e Sharma, S. (2013); Bioplastics and their thermoplastic blends from *Spirulina* and *Chlorella* microalgae; *Journal of Applied Polymer Science*, 130 (5): 3263-3275
- Zhekisheva, M., Boussiba, S., Khozin-Goldberg, I., Zarka, A., Cohen, Z. (2002); Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters; *Journal of Phycology*, 38: 325-331.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., van't Riet, K. (1990); Modeling of the bacterial growth curve; *Applied Environmental Microbiology*, 56: 1875-1881.

Anexos 1

Método BF3 (Trifluoreto de boro)

Reagentes: Dissolver 2g de NaOH em 10ml de metanol e agitar no agitador com magnete, só se perfaz os 100ml depois da agitação.

Para a solução saturada de NaCl: dissolver NaCl em aproximadamente 200ml de H₂O

Ensaio:

- Ligar o banho a 80°C
- Pesar 2X, para balões de destilação de 50ml, 150mg de amostra (ou raspar o que existe na pêra para o balão)
- Adicionar 4ml de sol. metanólica NaCl + reguladores (esferas pequenas para não deixar ferver)
- Colocar no banho (c/ suporte e refrigeração ligada) durante 5 a 10 minutos e agitar a cada 1 minuto, até aparecerem gotas de matéria gorda.
- Adicionar, através do tubo refrigerador, 5ml de trifluoreto de boro e deixar + 3 minutos
- Adicionar, à mistura em ebulição, 3ml de iso-octano através do tubo refrigerador
- Retirar o balão do calor e, ainda quente, adicionar 20ml de solução de NaCl.
- Tapar o balão e agitar fortemente (\pm 15 segundos)
- Colocar nível de líquido no balão junto ao "pescoço" adicionando mais solução saturada de NaCl.
- Após separação das fases, transferir 2 a 2,5ml da camada superior para um tubo (com algodão e sulfato de cobre anidro) para ser filtrado
- Analisar o líquido no Cromatógrafo